

Antikörper-vermittelte Kopplung magnetischer Nanopartikel an Endothel- und Tumorzellen

**Eine *in vitro* Studie zur magnetischen
Wärmebehandlung**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Elke Dietmar
geboren am 21.04.1980 in Gotha**

1. Gutachter: PD Dr. I. Hilger, Jena

2. Gutachter: Prof. Dr. D. Gottschild, Jena

3. Gutachter: PD Dr. Th. Böhm, Chur

Tag der öffentlichen Verteidigung: 19.06.2006

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Symbole und Abkürzungen	5
Verzeichnis verwendeter Einheiten	6
Vorsätze bei Größeneinheiten	7
Verzeichnis verwendeter Indices	7
1. Zusammenfassung	8
2. Einleitung	10
3. Material	20
3.1. Substanzen, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	20
3.2. Geräte	22
4. Methoden	25
4.1. Zellkultur	25
4.1.1. Beschreibung der verwendeten Zelllinien	25
4.1.2. Zellkulturbedingungen	26
4.1.3. Subkultivierung und Züchtung der Zellen	27
4.1.4. Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension	27
4.1.5. Einfrieren von Zellen	28
4.1.6. Kontrolle der Zellen auf Mycoplasmeninfektion mittels DAPI-Test	29
4.2. Grundlagen der angewandten Methoden	29
4.2.1. Proteinbestimmung nach Bradford	29
4.2.2. Eisen- bzw. Eisenoxidbestimmung	30
4.3. Darstellung der verwendeten Magnetischen Nanopartikel	32
4.4. Untersuchungen zur unspezifischen Bindung	32
4.5. Untersuchungen zur spezifischen Bindung	33
4.5.1. Rezeptorexpression im Endothelzell- und Tumorzellmodell	34
4.5.1.a. Das Endothelzellmodell	34
4.5.1.b. Das Tumorzellmodell	34
4.5.2. Kontrolle der Rezeptorexpression der Zelllinien mittels FACS Analyse... 35	
4.5.2.a. Kontrolle der Rezeptorexpression im Endothelzellmodell	36
4.5.2.b. Kontrolle der Rezeptorexpression im Tumorzellmodell	36
4.5.3. Spezifische Bindung von Ferrofluiden an Endothelzellen mit der Mehrschrittmethode (Two Step Methode)	37
4.5.4. Trennung von magnetisch markierten von nicht markierten Zellen mit der Miltenyi Separationssäule	40

4.5.5. Spezifische Bindung magnetischer Nanopartikel an Zellen mit der Einschrittmethode (One Step Methode)	41
4.5.5.1.a. Herstellung der CD106-Brückenmolekül-Sonde	42
4.5.5.1.b. Magnetische Markierung der SVEC4-10 Zellen mit der Brückenmolekül-Sonde	43
4.5.5.2.a. Herstellung der funktionalisierten Sonden	44
4.5.5.2.b. Magnetische Markierung von Endothel- und Tumorzellen mit funktionalisierten Sonden	45
4.6. Magnetische Wärmebehandlung der Zellen im Magnetwechselfeld	46
5. Ergebnisse	49
5.1. Auswertung des DAPI-Tests	49
5.2. Unspezifische Bindung magnetischer Nanopartikel an Makrophagen	49
5.3. Spezifische Bindung von magnetischen Nanopartikeln an Zellen	52
5.3.1. FACS Untersuchungen zur Rezeptorexpression an den verwendeten Zellmodellen	52
5.3.2. Magnetische Markierung von Endothelzellen mit der Mehrschrittmethode unter verschiedenen Kombinationen der Antikörper- und Ferrofluidinkubation .	54
5.3.2.1. Zellmarkierung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit Antikörpern und Ferrofluid	54
5.3.2.2. Zellmarkierung in Abhängigkeit von der Dauer der Ferrofluidinkubation	57
5.3.3. Magnetische Markierung von Zellen mit der Einschrittmethode	62
5.3.3.1. Markierung von SVEC4-10 Zellen mit der Brückenmolekül-Sonde...	62
5.3.3.2. Markierung von Zellen mit funktionalisierten Sonden.....	64
5.3.3.2.a. Magnetische Markierung der SVEC4-10 Zellen unter Einsatz der funktionalisierten CD106-Sonden.....	64
5.3.3.2.b. Magnetische Markierung der SK-BR-3 Zellen unter Einsatz der funktionalisierten Her-2-Sonden	66
5.4. Messungen im Magnetwechselfeld	68
5.4.1. Temperaturentwicklung nach unspezifischer Aufnahme von magnetischen Nanopartikeln	68
5.4.2. Temperaturentwicklung nach spezifischer Bindung magnetischer Nanopartikel an Zellen.....	69

5.4.2.1. Temperaturentwicklung nach magnetischer Markierung von Endothelzellen mit der Mehrschrittmethode.....	69
5.4.2.2. Temperaturentwicklung nach magnetischer Markierung von Zellen mit der Einschrittmethode	69
5.4.2.2.a. Temperaturentwicklung nach Behandlung von SVEC4-10 Zellen mit der Brückenmolekül-Sonde	69
5.4.2.2.b. Temperaturentwicklung nach Behandlung von SVEC4-10 Zellen mit der funktionalisierten CD106-Sonde.....	69
5.4.2.2.c. Temperaturentwicklung nach Behandlung von SK-BR-3 Zellen mit der funktionalisierten Her-2-Sonde.....	70
6. Diskussion	72
6.1. Unspezifische Aufnahme von magnetischen Nanopartikeln	72
6.2. Spezifische Aufnahme von Ferrofluiden mit der Mehrschrittmethode	75
6.3. Spezifische Aufnahme von Ferrofluiden mit der Einschrittmethode	80
6.4. Spezifische Aufnahme von Ferrofluiden unter Einsatz der Einschrittmethode mit funktionalisierten Sonden	81
6.5. Temperaturmessung im Magnetwechselfeld.....	84
6.5.1. Unspezifische Bindung	84
6.5.2. Spezifische Bindung von Ferrofluiden mit der Mehrschritt- und Einschrittmethode.....	85
6.5.3. Spezifische Bindung von funktionalisierten Sonden unter Einsatz der Einschrittmethode.....	86
7. Schlussfolgerung	88
8. Literaturverzeichnis.....	90
Danksagung	95
Lebenslauf.....	97
Ehrenwörtliche Erklärung.....	98

Verzeichnis der verwendeten Symbole und Abkürzungen

AAS	A tom a bsorptionss s pektrometrie
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Aqua bidest.	2 fach destilliertes Wasser
AK	A ntikörper
BSA	b ovine s erum a lbumin (Rinderserumalbumin)
CO ₂	Kohlendioxid
CD	cluster of differentiation
DAPI	4-6- D iamidino-2- p henylindol-di-hydrochlorid
DMEM	D ulbecco`s M odifiziertes E agle M edium
DMSO	D imethyl s ulfoxid
EDTA	E thylene d iamine t etraacetic a cid (Äthylendiamintetraessigsäure)
EDC x HCL	N`ethyl- c arbodiimid h ydrochlorid
et al.	und andere
f	Frequenz (Hz)
FACS	F luorescence A ctivated C ell S orting
Fe	Eisen
FF	Ferrofluid
FKS	fetales Kälberserum
g	Fallbeschleunigung (m/s ²)
H	Magnetische Feldstärke (A/m)
Her-2	Herceptin-2 / neu
LDL	l ow d ensity l ipoprotein
KA	Kontrollansatz
Konz.	Konzentration
m	Masse
M	molare Masse
MHC	m ajor h isotcompatibility c omplex (Haupthistocompatibilitätskomplex)
MNP	m agnetische N anopartikel
MRT	M agnetresonanztomographie

MWF	m agnetisches W echsel f eld
n	Stoffmenge
NaOH	Natronlauge
O ₂	Sauerstoff
PBS	p hosphate b uffered s aline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung, isotonisch)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SK-BR-3 Zellen	humane Adenokarzinomzellen der Brust
SP	S eparations p uffer
SVEC4-10 Zellen	simian virus 40 transformierte Endothelzellen
TNF α	T umor N ekrose F aktor α
T	Temperatur (°C)
ΔT	Temperaturdifferenz/Temperaturänderung (K)
V	Volumen
VA	Versuchsansatz
VCAM-1	V ascular c ell a dhesion m olecule-1
VEGF	V ascular e ndothelial g rowth f actor
ZZ	Z ell z ahl

Verzeichnis verwendeter Einheiten

l	Liter
g	Gramm
h	Sunde
min	Minute
s	Sekunde
m	Meter
cm ²	Quadratzentimeter

Vorsätze bei Größeneinheiten

k	Kilo (10^3)
c	Zenti (10^{-2})
m	Milli (10^{-3})
μ	Mikro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})
p	Piko (10^{-12})

Verzeichnis verwendeter Indices

Fe	Eisen
Fe_3O_4	Magnetit
Fe_2O_3	Maghemit
FF	Ferrofluid

1. Zusammenfassung

Tumorerkrankungen spielen im heutigen Klinikalltag eine immer größere Rolle. Zur Behandlung von bösartigen Erkrankungen werden neben chirurgischen Verfahren, Chemotherapie und Bestrahlung eingesetzt. Der Bedarf an Optimierung der Therapieerfolge und das große Spektrum von Nebenwirkungen dieser Therapieverfahren verdeutlichen den Forschungsbedarf in Hinblick auf alternative Methoden. Ein potentiell alternatives Verfahren ist die magnetische Wärmebehandlung. Ziel dieser Methode ist es kleinste Eisenoxidpartikel in Form von magnetischen Nanopartikeln im Tumorgewebe anzureichern und mit einem externen Magnetwechselfeld eine lokalisierte Erwärmung der Region zu erzeugen. Durch einen Temperaturanstieg auf über 50°C kann das Gewebe irreversibel geschädigt werden. Durch die bisher durchgeführte intratumorale Applikationsform sind multifokale Karzinome oder unzugängliche Tumore ungenügend erreichbar. Aus diesem Grund ist eine selektive Anreicherung von magnetischem Material und eine einfache Darreichungsform z.B. als intravenöse Applikation notwendig.

Einen interessanten Ansatz bietet hierfür die selektive Anreicherung von magnetischem Material über spezifisch an eine Zielstruktur bindende Antikörper. Hierbei ist eine intravasale Applikation mit Anschwemmung zum Zielgewebe über das Gefäßsystem vorstellbar. Als Zielstrukturen können bekannte Rezeptoren, die auf der Zelloberfläche von Tumorzellen überexprimiert werden, Verwendung finden. Des Weiteren bietet die gesteigerte Expression definierter Rezeptoren auf Zellen von Tumorgefäßen verglichen mit gesunden Endothelzellen einen Ansatzpunkt. So ist eine antikörpervermittelte Kopplung von magnetischem Material an Tumorgefäß- bzw. Tumorzellen vorstellbar. Die anschließende Erwärmung im magnetischen Wechselfeld kann hierbei eine Schädigung dieser Zellen induzieren.

Zur Untersuchung dieses Ansatzes wurden in der *in vitro* Situation Endothelzellen und Tumorzellen über eine antikörpervermittelte Kopplung mit magnetischen Nanopartikeln über verschiedene Bindungsmodelle beladen.

Um das Potential und die Mechanismen der spezifischen Bindung beurteilen zu können, wurden Vergleichsuntersuchungen zur unspezifischen Bindung von Nanopartikeln an Makrophagen durchgeführt. Hierbei konnte eine zeitabhängige Steigerung der Partikelaufnahme beobachtet werden (2h Inkubation 12,5 pg/Zelle; 12h Inkubation 73,5 pg/Zelle). Eine Abhängigkeit der im magnetischen Wechselfeld

1. Zusammenfassung

(MWF) erzielten Temperaturerhöhung der magnetisch markierten Zellen von der Behandlungszeit wurde ebenfalls ermittelt (12h, $\Delta T=15,31\text{K}$).

Die Untersuchungen der antikörpervermittelten Kopplung magnetischer Nanopartikeln an Zellen wurden mit der sogenannten Mehrschrittmethode bzw. Einschrittmethode durchgeführt. Beim Einsatz der Mehrschrittmethode wurden den Endothelzellen im ersten Schritt Antikörper, im zweiten Schritt magnetische Nanopartikel zugegeben. Bindungsvermittler waren hierbei die Brückenmoleküle Biotin und Streptavidin. Zur Analyse der Einflüsse von Inkubationszeiten und Temperaturen auf die zellulären Prozesse der rezeptorvermittelten Partikelaufnahme erfolgte die Variation der Behandlungsbedingungen. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten unter verschiedenen Behandlungsbedingungen (Inkubation Antikörper von 30 min bis 90 min) eine stetige Abnahme der Eisenoxidmenge in den Zellen mit zunehmender Nanopartikelinkubationsdauer (bis 90 min). Diese Abnahmetendenzen sind vermutlich auf Endozytose- und Exozytoseprozesse der Zellen zurückzuführen. Die zellgebundene Menge an Nanopartikeln war hierbei zu gering um eine Temperaturerhöhung im MWF zu erzeugen.

Die Verwendung der Einschrittmethode ermöglichte die Gabe der Antikörper und Nanopartikel als sogenannte Sonden in einem Schritt zu den Zellen. Es wurden hierbei drei Sondenmodelle untersucht. Zum einen wurde eine Sondenkopplung über die bereits beschriebenen Brückenmoleküle erreicht. Die Behandlung der Endothelzellen mit dieser Sonde zeigte mit zunehmender Inkubationszeit (bis 90 min) eine Abnahmetendenz der Eisenoxidmengen. Voraussichtlich sind hierfür Exozytoseprozesse der Zellen verantwortlich. Zwei weitere Sonden wurden über chemische Bindung hergestellt. Hierbei wurden Antikörper gegen Endothelzell- bzw. Tumorzellrezeptoren an Nanopartikel gekoppelt und die Zellen für 30 min mit diesen Sonden behandelt. Eine spezifische Bindung der Sonden an Endothel- und Tumorzellen konnte erreicht werden. Wobei die hohe Beladung der Tumorzellen mit magnetischem Material (1,242 pg/Zelle) bei der Messung im MWF zu einer Temperaturerhöhung von 5 K führte.

In den Untersuchungen konnte eine spezifische Markierung von Zellen mit magnetischen Nanopartikeln erreicht werden. Die Steigerung der Zellmarkierung ist jedoch erforderlich. Hierzu müssen zelluläre Einflüsse (Endozytose und Exozytose) auf die Partikelaufnahme aufgeklärt und die Weiterentwicklung von Sonden vorangebracht werden.

2. Einleitung

In der heutigen Zeit haben kleinste Teilchen, sogenannte Nanopartikel, Einzug in das tägliche Leben gehalten. So finden diese winzigen Teilchen Anwendung in der Kosmetik z.B. in Sonnencremes, im Haushalt bei der Beschichtung der Badewanne, in der Autoindustrie und natürlich auch in der Medizin (Nanoscience, 2004). Im medizinischen Bereich sind es unter anderem magnetische Teilchen sogenannte magnetische Nanopartikel die verwendet werden. Bei magnetischen Nanopartikeln handelt es sich um superparamagnetische Teilchen, die aus einem Eisenoxidkern und einer bioverträglichen Hülle (z.B. Carboxymethyldextran) bestehen. Suspensionen dieser ferromagnetischen Teilchen mit einem mittleren Kerndurchmesser von 10 nm, die in einer Trägerflüssigkeit gelöst sind, werden als Ferrofluide bezeichnet. Sie vereinen normale rheologische Eigenschaften mit magnetischen Kraftwirkungen, die sich bereits bei schwachen Magnetfeldern bemerkbar machen (Odenbach, 2001).

Eine etablierte Anwendung der magnetischen Partikel findet sich in der radiologischen Diagnostik, wo diese als Kontrastmittel im MRT eingesetzt werden. Hierbei zugelassene Substanzen sind u.a. Endorem und Resovist (Taupitz et al., 2003).

Der weitere Einsatz magnetischer Nanopartikel wird in diversen Forschungsansätzen untersucht. So werden in experimentellen Ansätzen kleinste Partikel im Rahmen der molekularen Bildgebung zur Tumordiagnostik mittels MRT eingesetzt. Hierbei erfolgt unter anderem eine rezeptorgerichtete bzw. antikörpervermittelte Kontrastierung von Zielgewebe (z.B. Tumorgewebe) (Taupitz et al., 2003). Des Weiteren finden sich interessante Einsatzgebiete von magnetischem Material in der Onkologie. So können Partikel beispielsweise als Medikamententräger verwendet werden. Hierbei ist theoretisch die Akkumulation des Medikaments mit Hilfe des magnetischen Materials und eines starken Magnetfeldes an einen Zielort möglich (Taupitz et al., 2003). Zum anderen werden die Partikel im Rahmen der magnetischen Wärmebehandlung verwendet. Hierbei sind die Hyperthermie und die magnetische Thermoablation zu nennen (Taupitz et al., 2003). Bei diesen Verfahren wird versucht, durch Erwärmung eine Schädigung von Tumorgewebe zu erzielen.

Der Einsatz des magnetischen Materials in der onkologischen Therapie bzw. Forschung ist vielversprechend und bedeutend, da im Jahr 2000 die Ursache für

2. Einleitung

jeden 4. Todesfall ein Krebsleiden war. Somit liegen die bösartigen Neubildungen auf Rang 2 der Todesursachen in Deutschland hinter Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems (Rübenach, 2001). Hierbei ist in der westlichen Welt die häufigste Krebserkrankung der Frau das Mammakarzinom. Es macht etwa 18% aller bösartigen Erkrankungen aus. Es versterben jährlich etwa 18000 Frauen an dieser Krebserkrankung (Medicine Worldwide, 2004; Batzler et al., 2002).

In der bisherigen Therapie von Brustkrebserkrankung kamen Operationsverfahren und Strahlentherapie zum Einsatz. Ebenfalls ist die Anwendung von adjuvanter bzw. neoadjuvanter Chemotherapie und Hormontherapie etabliert. Ausschlaggebend für die Wahl und die Wirksamkeit der Therapie ist die Tumorausbreitung zum Erkennungszeitpunkt, die histologische Differenzierung des Gewebes und der Metastasierungsgrad. Jedoch hat jede Therapie unerwünschte Nebenwirkung (Chemotherapie mit Beeinflussung von gesunden, teilungsaktiven Zellen des Verdauungstraktes, der Haut und Haare mit Haarausfall und des Knochenmarks mit Blutbildveränderungen) bzw. nur einen begrenzten Einsatzbereich (Operation nur bei guter chirurgischer Zugänglichkeit möglich) (Medicine Worldwide, 2004; Deutsche Krebsgesellschaft e. V., 2001).

Daher ist die Erforschung alternativer Therapieverfahren erforderlich. Ein bereits erwähntes Forschungsgebiet ist die magnetische Wärmebehandlung.

Hierbei ist ein in den letzten Jahren viel erforschtes alternatives Therapieverfahren die Hyperthermie. Das Wort Hyperthermie stammt aus dem Griechischen und bedeutet Übererwärmung (Medicine Worldwide, 2002). Hierbei soll die Wärme als Mittel in der Therapie maligner Erkrankungen eingesetzt werden. Bei Hyperthermieverfahren werden Temperaturen von 41 - 44°C in einer definierten Körperregion angestrebt. Dabei kommt es ab 42°C zu einem direkt zytotoxischen Effekt. Bei niedrigeren Temperaturen (40°C) kommt es zu einer Sensibilisierung von Tumorzellen, die in Kombinationsverfahren z.B. Bestrahlung ausgenutzt wird (Wust & Molls, 1999). Ebenso treten bei Temperaturen von 40°C sensibilisierende Effekte für bestimmte Chemotherapeutika, die speziell an der DNA von Tumorzellen angreifen, auf (Medicine Worldwide, 2002).

Laut Pschyrembel, dem Klinischen Wörterbuch der Medizin, wird die Hyperthermie meist in Kombination mit Chemo- oder Strahlentherapie eingesetzt. Die Hyperthermie wird hierbei als ein Übererwärmungsverfahren in der Onkologie beschrieben, welches die höhere Temperaturempfindlichkeit von Tumorzellen in der S-Phase des

2. Einleitung

Zellzyklus, verglichen mit normalen Zellen, ausnutzt (Pschyrembel, 258. Auflage, 1998).

Die Vorteile der Anwendung von Hyperthermieverfahren in Kombination mit z.B. Radiotherapie konnten in verschiedenen Studien belegt werden. So zeigten Overgaard et al. (1996), dass die hypertherme Radiotherapie eines lokal rezidierten oder metastasierten malignen Melanoms, bezogen auf die Remissionsrate, der alleinigen Radiotherapie deutlich überlegen ist. Eine Studie von Vernon et al. (1996) stellte bei Mammakarzinomrezidiven nach lokaler Hyperthermiebehandlung eine verbesserte Ansprechbarkeit auf die Radiotherapie fest. Darüber hinaus konnten Valdagni et al. (1993) eine verbesserte 5-Jahres-Überlebensrate von Kopf-Hals-Karzinomen mit fortgeschrittenen Lymphknotenmetastasen nach Radio-/Thermotherapie im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie zeigen.

In der klinischen Erprobung finden sich auch Hyperthermie-Chemotherapie-Kombinationen. So wurde in einer Phase II Studie die Kombination von regionaler Hyperthermie und neoadjuvanter Chemotherapie bei Hochrisiko-Weichteilsarkomen überprüft (Issels et al., 1990). Die Daten weisen eine tumorfreie 8-Jahres-Überlebenszeit von 46% aus, was insbesondere im Hinblick auf eine niedrige Metastasierungsrate ein hervorragendes Resultat darstellt (Wust & Molls, 1999).

Die bisherigen Erkenntnisse (geringere Rezidivraten, bessere Therapieeffekte bei Tumoren) verdeutlichen den Vorteil einer Kombination von Hyperthermieverfahren mit Strahlen- bzw. Chemotherapie verglichen mit der Monotherapie dieser Standardverfahren.

Die Kombination von Hyperthermie mit anderen Verfahren zeigt eine gute Wirksamkeit, jedoch kann die alleinige Anwendung von Hyperthermie nicht zur irreversiblen Schädigung von Tumorzellen und zur Tumorvernichtung führen (Madersbacher et al., 1996).

Für eine irreversible Tumorschädigung sind Temperaturen, die über denen der Hyperthermie liegen, notwendig. Eine Methode, bei der Temperaturen jenseits der 50 °C erreicht werden und die in der Lage ist Gewebe zu koagulieren, wird als Thermoablation bezeichnet (Medicine Worldwide, 2002). Zur Erzielung solch hoher Temperaturen werden verschiedene Techniken wie z.B. Laserapplikatoren, Ultraschall, Radiofrequenzablation (Medicine Worldwide, 2002) oder der Einsatz magnetischen Materials in Form von Ferrofluiden angewandt. Hierbei werden magnetische Nanopartikel selektiv im Tumor angereichert. Durch die Anlage eines

2. Einleitung

externen magnetischen Wechselfelds wird dessen Energie von den Eisenoxidpartikeln absorbiert und in Wärme umgewandelt (durch Brown'sche und Neel'sche Relaxation). Dies führt zur Erwärmung des Zielgewebes (Hergt et al., 1998). Eine *in vitro* Studie von Hilger et al. (1997) an Schweinelebern konnte eine Abhängigkeit zwischen applizierter Eisenoxidmenge und erreichten Temperaturanstieg zeigen.

In *in vitro* Untersuchungen an humanen Adenokarzinomzellen konnte eine irreversible Schädigung der Tumorzellen bei Temperaturen von 58 - 63 °C über 4min erreicht werden (Hilger et al., 2001a). Die Wirksamkeit der magnetischen Thermoablation unter *in vivo* Bedingungen wurde von Hilger et al. (2001b) an tumortragenden Mäusen untersucht. In den Tumor, ein Adenokarzinom (MX1 Zelllinie) im Bereich des lateralen Abdomens, wurde ein Ferrofluid appliziert und die Lage im Tumor mittels Röntgen überprüft. Nun wurde der Tumor einem Magnetwechselfeld ausgesetzt (H: 11 kA/m; f: 410 kHz). Es konnte dabei nach 2 minütiger Exposition eine Temperatur im Tumor von 63 °C gemessen werden. Diese stieg bis zum Ende der Behandlung nach 4 min auf 71°C an. Die histologische Aufarbeitung des Tumorgewebes nach der Behandlung zeigte das deutliche Schädigungsmuster der Koagulationsnekrose in den Zellen. Dies beweist das Zerstörungspotential dieser Methode. Bei diesen Verfahren ist für die Anreicherung des magnetischen Materials in den Tumor die genaue Kenntnis der Tumorlokalisation bedeutend. Daher lassen sich mit diesem Verfahren nur lokalisierbare und der Applikation zugängliche Tumore therapieren. Eine selektive Anreicherung von magnetischem Material in Tumoren, die der intratumoralen Applikation nicht zugänglich sind oder deren genaue Lokalisation nicht bekannt ist, ist nicht möglich.

Hierfür benötigt man unter anderem einen alternativen Zugangsweg zum Tumor. Hierbei bietet das Gefäßsystem einen Ansatz. Tumoren sind stark vaskularisiert und so über den Blutstrom gut erreichbar. Nach intravasaler Applikation von magnetischem Material ist das Erreichen des Tumors über den Blutstrom durchaus denkbar. Zum Anderen sind „intelligente“ Partikel notwendig, die nach Erreichen des Tumors via Blutbahn spezifisch und selektiv an das Tumorzielgewebe binden und andere Strukturen nicht beeinflussen. Eine Lösung hierfür bieten spezifische Antikörper gegen geeignete Zielstrukturen.

2. Einleitung

In der radiologischen Diagnostik werden Kontrastmittel entwickelt, die ein strukturspezifisches Signal erzeugen. So sind Forschungsgruppen damit beschäftigt, magnetische Nanopartikel mit spezifischen Proteinen (Antikörper, Substraten für Rezeptoren) zu koppeln und damit im MRT eine Kontrastierung von pathologischen Gewebsveränderungen zu erreichen. Ein Beispiel hierfür ist z.B. die Untersuchung der Expression von Sekretin- und Transferrin-Rezeptoren, die auf der Oberfläche von Tumorzellen verstärkt gebildet werden. Mit der Anreicherung von Nanopartikeln über diese Rezeptoren bietet sich ein Ansatz für eine selektive MR-tomographische Diagnostik solcher Tumoren (Högemann et al., 2001; Taupitz et al., 2003). So wurden in Untersuchungen von Remsen et al. (1996) *in vivo* an Raten monokristalline Eisenoxid-Nanopartikel mit monoklonalen Antikörpern konjugiert und zur noninvasiven Diagnostik von kleinzelligen Bronchialkarzinomen mittels MR eingesetzt. In einem von Grana et al. (1996) veröffentlichten nuklearmedizinischen Verfahren konnten mit der sogenannten „Three Stepp Strategie“ Tumore visualisiert werden. Hierbei wurden zunächst biotinylierte Antikörper gegen ein tumorspezifisches Antigen appliziert, 24h später wurden Streptavidin Partikel und weitere 24h später biotinylierte Radioisotope verabreicht. Es kam so über das Biotin-Streptavidin-System (Bayer et al., 1980) zu einem schrittweisen Aufbau des bildgebenden Komplexes, der an den Rezeptor gekoppelt war und mittels Szintigraphie eine Tumordarstellung ermöglichte.

Es stellt sich an dieser Stelle die Frage, ob nicht nur diagnostisch, sondern auch therapeutisch im Rahmen der magnetischen Wärmebehandlung, nach intravasaler Verabreichung von magnetischen Nanopartikeln, eine Anreicherung im Tumorgewebe über spezifische Antikörper erzielt werden kann. Auf diese Weise besteht die Möglichkeit den Tumor nicht nur sichtbar zu machen, sondern ihn auch mittels Erwärmung im magnetischen Wechselfeld selektiv zu zerstören.

Für den Ansatz der „intelligenten Nanopartikel“, die spezifisch über Antikörper an das Tumorgewebe binden sollen, ist die Kenntnis von tumorspezifischen Antigenen als Zielstrukturen (z.B. Rezeptoren) von Bedeutung. Ebenso muss das magnetische Material über Antikörper an den Rezeptor gebunden werden, was eine Interaktion der Antikörper und der Nanopartikel am Rezeptor notwendig macht.

Der Einsatz Antikörper-gekoppelter-MNP zur spezifischen Anreicherung in Tumorgewebe wurde bereits von Shinkai et al. (1994) in der *in vitro* Situation

2. Einleitung

untersucht. Hierbei wurden Konjugate aus Magnetoliposomen und Antikörpern gegen Kolonkarzinomzellen hergestellt. Die spezifische Bindung dieser Komplexe an humane Kolonkarzinomzellen (Zelllinie BM314) und die daraus resultierende magnetische Markierung der Zellen war 6 mal so groß wie die unspezifische Markierung der Tumorzellen in den Kontrollen. Dieser Ansatz zeigt, dass eine spezifische Anlagerung von magnetischem Material an Tumorzellen möglich ist.

Wie bereits erwähnt hat das Mammakarzinom neben den kolorektalen Tumoren in Europa einen großen Anteil an den bösartigen Neuerkrankungen. Daher ist die Kenntnis einer geeigneten Zielstruktur auf der Oberfläche von Brustkrebszellen entscheidend für den Ansatz der „intelligenten Nanopartikel“.

Untersuchungen konnten Rezeptoren auf gesunden Zellen der menschlichen Brust, die an Wachstum und Entwicklung beteiligt sind, ausmachen. Die Expressionssteigerung des als Her-2-Protein bezeichneten Rezeptors um das 10 bis 100 fache konnte auf Brustkrebszellen in 30% der Tumore der Brust nachgewiesen werden (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2001). Durch die Überexpression des Rezeptors im Tumor, verglichen mit dem gesunden Gewebe, ist er als Target geeignet. Eine spezifische Anreicherung magnetischen Materials an Brustkrebszellen über den Her-2/neu-Rezeptor ist daher durchaus denkbar. Für die Behandlung im magnetischen Wechselfeld im Rahmen des thermoablativen Ansatzes stellt die weibliche Brust, auf Grund ihrer anatomischen Lage und guten Zugänglichkeit, ebenfalls ein gutes Ziel dar.

Nach der intravasalen Applikation des magnetischen Materials muss es die Blutbahn verlassen um zum Zielgewebe zu kommen. Die Blutgefäße mit ihren Endothelzellen würden also für diese Komplexe die erste Barriere zwischen Blutstrom und Gewebe darstellen. Daher ist ein weiterer interessanter Ansatz die Endothelzellen der Tumorgefäße als Targets zu verwenden.

Die Endothelzellen mit ihren Antigenen können direkt über den Blutstrom erreicht werden. Eine selektive Anreicherung von magnetischem Material über Antikörper ist vorstellbar, zumal eine intravasale Applikation der Nanopartikel minimalinvasiv und wenig aufwendig scheint. Voraussetzung hierfür ist die Kenntnis von Oberflächenantigenen, die Endothelzellen von Tumorgefäßen von Endothelien des gesunden Gewebes unterscheiden. Beispielhaft ist hierbei die Expression von VEGF Rezeptoren (VEGF- vascular endothelial growth factor) zu nennen. Diese werden auf

2. Einleitung

Tumorendothelien stark expremiert, im gesunden Gewebe kommen sie jedoch kaum vor (Martiny-Baron et al., 1995; Brown et al., 1995).

Im Rahmen des thermoablativen Ansatzes ist, nach Exposition magnetisch markierter Gefäßzellen im magnetischen Wechselfeld, eine Schädigung des Tumorgefäßsystem denkbar. Idealerweise führt dies zu einer Verminderung der Nährstoff- und Sauerstoffzufuhr mit der Folge eines geringeren Wachstums bzw. des Tumorunterganges.

Aufgrund der benannten Angriffspunkte, Tumorgewebe und Gefäßsystem, wurde in dieser Arbeit die Bindung von Nanopartikeln über Antikörper an geeignete Antigene im Rahmen der magnetischen Wärmebehandlung sowohl an Tumorzellen als auch an Endothelzellen untersucht. Das Gesamtziel dieser Untersuchungen bestand darin, eine spezifische antikörpervermittelte Bindung von magnetischen Nanopartikeln an Zellen *in vitro* zu realisieren. Damit sollte überprüft werden, ob die Idee der intelligenten Nanopartikel, die nach intravasaler Applikation ihr Ziel finden, im Rahmen der magnetischen Wärmebehandlung zu verwirklichen ist.

Im Rahmen von Voruntersuchungen galt es die unspezifische Aufnahme von magnetischem Material durch Makrophagen und die zeitabhängige Dynamik dieser Aufnahme zu analysieren. Die unspezifische Aufnahme von magnetischen Nanopartikeln durch Makrophagen wurde bereits in Untersuchungen von Wilhelm et al. (2002) erforscht. In dieser Studie und der hier vorliegenden Untersuchung finden sich jedoch Unterschiede bei den verwendeten Nanopartikeln und den Behandlungsbedingungen. Der Ansatz zur unspezifischen Bindung im Rahmen der vorliegenden Studie diente zum einen der Modellierung der unspezifischen Aufnahme des magnetischen Materials nach intratumoraler Applikation, zum anderen sollte ein Ausgangspunkt für den Vergleich der Mechanismen von unspezifischer und spezifischer Bindung geschaffen werden.

Die spezifische Bindung von magnetischem Material an Zellen erfolgte in dieser Arbeit zum einen über den CD106-Rezeptor an die SVEC4-10 Zellen des Endothelzellmodells, zum anderen an die SK-BR-3 Zellen mit dem Her-2/neu-Rezeptor des Tumorzellmodells. Die Expression des CD106-Rezeptors, der als Modellantigen des Gefäßzellmodells fungierte, konnte auf der Zelloberfläche der SVEC4-10 Zelllinie nachgewiesen werden. Aus Untersuchungen von Keil (2003) ist

2. Einleitung

bekannt, dass durch Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ eine Rezeptorexpressionssteigerung möglich ist. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurde in dieser Arbeit eine Rezeptorexpressionssteigerung nach festgelegten Stimulationsbedingungen durchgeführt. Die erneute Überprüfung des Stimulationserfolges konnte hierbei mit der FACS Analyse vorgenommen werden. Die Eignung des CD106-Rezeptors als Modellantigen war durch die starke Expression auf der Zelloberfläche und deren Beeinflussbarkeit gegeben. Eine Vergleichbarkeit des CD106-Rezeptors mit Rezeptoren auf Tumorgefäßzellen, die wie bereits beschrieben stärker expremiert werden als auf normalen Endothelzellen, ist daher durchaus möglich.

Beim Tumorzellmodell der SK-BR-3 Zellen handelt es sich um Zellen eines humanen Adenokarzinoms der Brust, die den Herceptin-2/neu-Rezeptor überexprimieren. Diese Zellen stellen, da sie direkt aus einem Brusttumor stammen und den bereits beschriebenen wichtigen Tumorrezeptor ausbilden, ein ideales Modell zur Untersuchung der spezifischen Bindung von Nanopartikeln an Tumorzellen dar.

In verschiedenen Studien wird die spezifische magnetische Markierung von Zellen beschrieben. So gelang es, wie bereits erwähnt, Grana et al. (1996) Tumore über Antikörper spezifisch zu markieren und diese so zu visualisieren. Die hierbei angewandte „Three-Step-Strategie“ machte sich das Biotin-Streptavidin-System zu nutzen. Biotinylierte Antikörper gegen ein tumorspezifisches Antigen wurden über Streptavidin-Partikel mit biotinylierten Radioisotopen gekoppelt und ermöglichten so eine Tumordarstellung. In der hier vorliegenden Studie war jedoch nicht die Tumor- bzw. Zelldarstellung, sondern die quantitative Untersuchung der Nanopartikelaufnahme durch die Zellen und deren Beeinflussung das Ziel. Hierfür erfolgte ebenfalls unter Einsatz des Biotin-Streptavidin-Systems die magnetische Markierung von CD106-Rezeptor positiven Endothelzellen. Diese wurden also mit der sogenannten Mehrschrittmethode zuerst mit biotinylierten Antikörpern und anschließend mit streptavidinhaltigen Nanopartikeln markiert. In Untersuchungen von Bayer et al. (1979) zum Biotin-Avidin-System konnte eine hohe Stabilität und Affinität des Komplexes nachgewiesen werden. Die Bindungskonstante K_d beträgt für diesen stabilen Komplex 10^{-15} M (Jenne et al., 1999). Auf Grundlage dieser Tatsachen war eine Kopplung der einzelnen Komponenten (Antikörper und Nanopartikel) gewährleistet. Die Analyse der Bindungsdynamik von Antikörper und Nanopartikel am Rezeptor, der Aufnahmeprozesse in die Zelle und deren Abhängigkeit von Zeit

2. Einleitung

und Temperatur erfolgte in Experimenten unter Variation der Behandlungsparameter (z.B. Zeit, Temperatur). Als Nachweis und zur Quantifizierung der Nanopartikelmenge in den Zellen wurde deren Eisengehalt mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) bestimmt. Die AAS ist eine etablierte Methode zur quantitativen Analyse von Elementen in atomarisierte Form. Bei einer Nachweisgrenze des Eisens von 28 µg/l war sie auch für geringe Mengen Eisen in den Zellen geeignet und wurde daher eingesetzt. Aus den ermittelten Eisenmengen konnte der Eisenoxidgehalt der verschiedenen Ansätze ermittelt werden. Die Bestimmung des Eisenoxidgehaltes war Endpunkt aller Untersuchungen (sowohl bei Analysen zur unspezifischen als auch zur spezifischen Bindung) und ermöglichte eine Beurteilung bzw. einen Vergleich der zellulären Partikelaufnahme auf Grundlage der verschiedenen Aufnahmemechanismen.

In einer weiteren Studie zur spezifischen Bindung magnetischer Nanopartikel an Zellen untersuchte Shinkai et al. (1994) in der *in vitro* Situation die Bindung von Antikörper konjugierten Magnetoliposomen an Kolonkarzinomzellen. Eine spezifische Bindung dieser Komplexe in einem Schritt an humane Kolonkarzinomzellen war so möglich. Diese Idee der Einschruttkopplung von Antikörper und Nanopartikel an Zellen wurde in der hier vorliegenden Studie aufgegriffen. Es wurden jedoch keine Magnetoliposomen-Konjugate verwandt, sondern für die sogenannte Einschruttmethode drei neue Sondenmodelle hergestellt. Zum einen wurden, über die bekannten Brückenmoleküle Biotin und Streptavidin, Antikörper und Nanopartikel miteinander zu der sogenannten Brückenmolekül-Sonde verbunden. Mit dieser galt es die Bindungsdynamik am CD106-Rezeptor und die zelluläre Partikelaufnahme am Endothelzellmodell zu untersuchen. Zum anderen erfolgte eine Kopplung von Antikörpern an die Nanopartikelhülle über deren chemische Aktivierung. Unter Einsatz der so hergestellten funktionalisierten Sonden gegen den CD106-Rezeptor bzw. gegen den Her-2/neu-Rezeptor konnte das spezifische Aufnahmepotential des Endothelzell- bzw. Tumorzellmodells für das magnetische Material überprüft werden. In diversen Studie sollte durch die Nanopartikelmarkierung von Zellen eine Bildgebung mittels MRT (Remsen et al., 1996, Weissleder et al., 1992) oder Szintigraphie (Grana et al., 1996) ermöglicht werden. In dieser Studie jedoch wurden die Zellen unter dem Aspekt der magnetischen Wärmebehandlung mit magnetischem Material beladen. Das Ziel hierbei war es, bei der Exposition der mit Nanopartikeln beladenen Zellen im magnetischen Wechselfeld, eine Temperaturerhöhung zu

2. Einleitung

erreichen und so einen Zusammenhang zwischen Eisenoxidgehalt und Wärmegenerierungspotential der Zellen zu ermitteln.

Unter Berücksichtigung der beschriebenen Gesichtspunkte wurden in der vorliegenden Studie folgende Zielsetzungen bearbeitet.

1. Analyse der unspezifischen Aufnahme von magnetischen Nanopartikeln am Beispiel von Makrophagen
2. Untersuchungen zur spezifischen Bindung von magnetischen Nanopartikeln an Zellen
 - a. Analyse der Beeinflussbarkeit der Nanopartikelaufnahme unter Einsatz der Mehrschrittmethode am Endothelzellmodell durch Variation der Behandlungsparameter
 - b. Untersuchungen im Rahmen der Einschrittmethode unter Verwendung verschiedener Nanopartikel-Sondenmodelle am Endothel- und Tumorzellsystem
3. Ermittlung der Temperaturerhöhung bei Exposition der magnetisch markierten Zellen im magnetischen Wechselfeld

3. Material

3.1. Substanzen, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Produkt	Hersteller
Alexa Fluor 488-Antikörper, goat anti rat IgG	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Anti-CD106-Antikörper, rat anti mouse	Southern Biotechnologies Associates, Inc., Birmingham, Alabama, USA
Anti-CD106-Antikörper, rat anti mouse, biotinyliert	Southern Biotechnologies Associates, Inc., Birmingham, Alabama, USA
Anti-Her-2/neu-Antikörper	Roche GmbH, Mannheim, Deutschland
Bechergläser	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bradford Reagenz	Selbst hergestellt, Jena, Deutschland
Bovine serum albumin (BSA), biotinfrei	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Cell Scraper	Greiner Bio-One GmbH, Labortechnik, Frickenhausen , Deutschland
Chamber Slide	Nalge Nunc International, Naperville, USA
CY 5.5	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
DAPI (4'6-Diamidino-2 phenyl-indol x 2 HCl p.A.)	Serva Elektrphoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Deckgläser	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
DMEM (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium) 500 ml	GIBCO BRL Life Technologies Ltd. Paisley Schottland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Fluka Chemie AG Buchs, Schweiz
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Einfrierröhrchen	Simport Plastics, Quebec, Kanada
Eppendorfcups	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht,

3. Material

	Deutschland
Ethanol	Fluka Chemie AG Buchs, Schweiz
Exicator	Schott Glas, Jena, Deutschland
FACS Röhrchen	BD Biosciences, Bedford, MA USA
Falcon-Tubes	Greiner Bio-One GmbH, Labortechnik, Frickenhausen , Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	GIBCO BRL Life Technologies Ltd. Paisley, Schottland
Glasmaterial	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland; Schott GmbH, Jena, Deutschland
Glasmesspipetten Schellbach, Klasse A5, Hirschmann	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Fluka Chemie AG Buchs, Schweiz
Isotyp-Kontrolle rat IgG _{1κ}	Southern Biotechnologies Associates, Inc., Birmingham, Alabama, USA
Isotyp-Kontrolle rat IgG _{1κ} , biotinyliert	Southern Biotechnologies Associates, Inc., Birmingham, Alabama, USA
J774 Mausmakrophagen	American Type Culture Collection, Manassas, USA
Kulturflaschen	Greiner Bio- One GmbH, Labortechnik, Frickenhausen , Deutschland; Nalge Nunc International, Dänemark
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Methanol	Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA
MS Separationssäule	Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA
Ferrofluid B1	Hergestellt vom Institut für Pharmazie Greifswald, Deutschland
NaOH	Fluka Chemie AG Buchs, Schweiz
PBS (phosphat buffered saline, 0,1 M, pH 7,2)	GIBCO BRL Life Technologies Ltd. Paisley, Schottland;
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland

3. Material

Präzisionsküvetten aus Quarzglas	Hellma GmbH, Müllheim-Baden, Deutschland
Reagenzgläser	Greiner Bio-One GmbH, Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
SK-BR-3 Zelllinie	American Type Culture Collection, Manassas, USA
Streptavidinhaltiges Ferrofluid	Hergestellt vom Institut für Pharmazie Greifswald, Deutschland
SVEC4-10 Zelllinie	American Type Culture Collection, Manassas, USA
Thoma-Zählkammer	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
(Recombinant murine) TNF α	R&D Systems Ins., Minneapolis, MN USA
Trypanblau	Riedel-de Haen AG, Seelze, Deutschland
Trypsin/EDTA 0,25%	GIBCO BRL Life Technologies Ltd. Paisley, Schottland
Ferrofluid V123	Innovent, Jena, Deutschland

3.2. Geräte

Produkt	Hersteller
Abzug	Köttermann
Akku Boy Pipettus-Akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt Deutschland
Akku Boy	Brand, Wertheim, Deutschland
Auswertungsprogramme	Sigma Plot 4.0, Microsoft Excel 97
Autoclav für Flüssigkeiten, Varioclav	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleissheim, Deutschland
Autoclav für Materialien, HVP-50	Hirayama Manufacturing Corporation, Japan
Brenner Vulcan	Hera Safe, Kendro Laboratory Products,

3. Material

	Hanau, Deutschland
Brutschrank	Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Digitalmultimeter	Keithley Instruments, Ohio, USA
Einfriergefäß	Qualilab, Bender & Hobein, USA
Eismaschine Ziegra	Dresdner Kühlanlagenbau, Dresden, Deutschland
Eppendorfpipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Flow Cytometer FACS Calibur	BD Biosciences, Bedford, MA, USA
Feinwaage isocal AC 211P	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Fotobearbeitungsprogramm	Adobe Photoshop 7.0
Generator und Spule	Typ HFP 061/05, EFD Induktionserwärmung Fritz Düsseldorf GmbH, Deutschland
Kupfer-Konstantan-Thermoelement Kupferdraht $\varnothing = 0,09$ mm Konstantandraht $\varnothing = 0,16$ mm	Selbst gefertigt, Jena, Deutschland
Kurzzeitwecker	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland
MACS Magnet	Miltenyi Biotec, Auburn, CA USA
Magnetrührer	IKA-Labortechnik GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mikroskop BX-50	Olympus, Hamburg, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop OlympusCK 40	Olympus, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	Hanna Instruments, Portugal
Reinraumwerkbank	Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Rüttler Unimax 2010	Heidolph Instruments & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Spektrophotometer	Biochrom Ltd., Cambridge, UK
Stichstofftonne Chronos	Messer Griesheim GmbH, Krefeld, Deutschland

3. Material

Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermostat	VEB MLW Prüfgerätewerk Medingen, DDR
Tiefkühltruhe (–18 °C)	Liebherr-Holding GmbH, Biberach an der Riss, Deutschland
Tiefkühltruhe (–80 °C)	Scientific Equipment Group GmbH, Egelsbach, Deutschland
Tischzentrifuge, Eppendorf Centrifuge 5414 D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Trockenschrank	Heraeus Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Vortexer	Scientific Industries, Inc. Bohemia, N.Y., USA
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge	Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Zentrifuge, gekühlt	Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland

4. Methoden

4.1. Zellkultur

4.1.1. Beschreibung der verwendeten Zelllinien

Bei den in Experimenten verwendeten Zelllinien handelt es sich um J774 Mausmakrophagen (Cell Line Service, Heidelberg, Deutschland), Endothelzellen der SVEC4-10 Zelllinie (American Type Culture Collection, Manassas, USA) und um SK-BR-3 Zellen.

Die SVEC4-10 Zellen (Abbildung 1a) stammen aus dem Endothel axillärer Lymphknotengefäße von virustransformierter Mäusen. Durch die Transformation mit dem SV40-Virus sind die Zellen unsterblich, ihr Aussehen und ihre Eigenschaften lassen sich dennoch mit denen normaler Endothelzellen vergleichen. Die Zellen exprimieren unter anderem LDL-Rezeptoren, MHC der Klasse I und II und CD106-Rezeptoren (VCAM 1) (O`Connell & Edidin, 1990; O`Connell et al., 1991; O`Connell & Rudmann, 1993).

Die J774 Makrophagen (Abbildung 1b) stammen aus der Muskulatur von Mäusen und sind zur Phagozytose befähigt. Sie sind eine adhärent wachsende Kultur und bilden auf ihrer Oberfläche unter anderem Rezeptoren für Antikörper und Komplementfaktoren aus (Ralph P et al., 1975 & 1976; Ralph P & Nakoinz, 1975 & 1977; Knowlton KU et al., 1996; Schissel SL et al., 1996).

Bei den SK-BR-3 Zellen handelt es sich um Zellen eines humanen Adenokarzinoms der Brust. Auf der Oberfläche dieser Zellen werden Her-2/neu-Rezeptoren exprimiert.

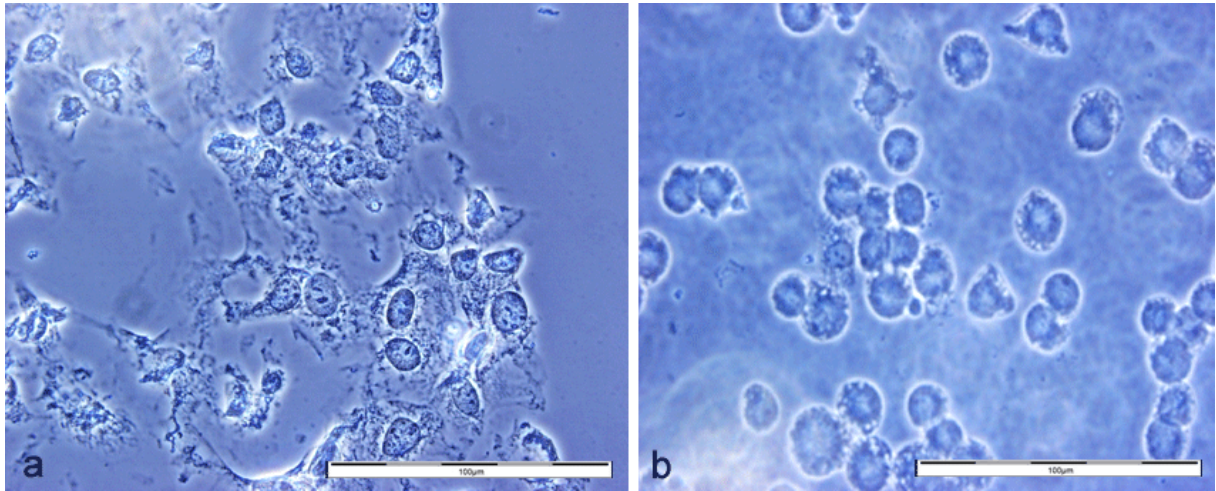


Abbildung 1: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der nativen Zellen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. a) Darstellung nativer SVEC4-10 Zellen; b) Abbildung nativer Makrophagen. Messbalken 100 µm.

4.1.2. Zellkulturbedingungen

Lösungen:

Zellkulturmedium: 500 ml (90 %) DMEM

50 ml (10 %) FKS

(für SVEC4-10 Zellen FKS bei 56 °C für 60 Minuten inaktiviert)

SVEC4-10 Zellen, J774 Makrophagen und SK-BR-3 Zellen wurden bei einer Temperatur von 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und einer Begasung von 5% CO₂ im Brutschrank gezüchtet. Diese Bedingungen werden als Standardkulturbedingungen bezeichnet. Die Kultivierung erfolgte auf Zellkulturflaschen mit Wachstumsflächen von 12,5 bis 160 cm². Die Verdopplungszeit betrug unter diesen Bedingungen 24 bis 36 Stunden.

Es wurden zunächst 1×10^7 Zellen aufgetaut. Hierfür wurde eine Kulturflasche mit einer Fläche von 75 cm² mit 15 ml Medium befüllt und im Inkubator vorgewärmt. Die Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und in die vorbereitete Flasche gegeben. Spuren des DMSO haltigen Einfriermediums, welches einen schädigenden Einfluss auf die Zellen hat, wurden durch einen Mediumwechsel 4 Stunden nach Aussaat beseitigt.

4. Methoden

4.1.3. Subkultivierung und Züchtung der Zellen

Lösungen: Zellkulturmedium (siehe 4.1.2)

PBS (pH 7,4, Konz. 0,1 M)

0,25 % Trypsin/ EDTA

Zwei bis drei Tage nach der Aussaat wurden die SVEC4-10 Zellen, die J774 Makrophagen und die SK-BR-3 Zellen unter dem Mikroskop zur Beurteilung der Zellmorphologie untersucht. Bei Konfluenz wurden die Zellen passagiert und auf neue Kulturflaschen aufgeteilt.

Hierfür wurde zunächst das verbrauchte Medium verworfen und die Zellen mit PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Die Ablösung der Zellen erfolgte mit einer 0,25%igen Trypsin/EDTA-Lösung. Auf eine Wachstumsfläche von 25 cm² wurden 0,5 ml Trypsin/ EDTA eingebracht und bei 37 °C im Brutschrank für 3 Minuten inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle des Ablösevorganges konnten die SVEC4-10 Zellen und die SK-BR-3 Zellen in frischem Medium aufgenommen und in einen Falcontube gegeben werden.

Eine Besonderheit ergab sich beim Ablösevorgang der J774 Makrophagen. Da sich die J774 Makrophagen durch die Trypsinierung nicht ausreichend lösten, wurden sie mit einem Zellschaber von den Kulturflaschen abgelöst und dann ebenso mit frischem Medium in einen Falcontube gegeben. Die Mediummenge betrug hierbei das Fünffache der Trypsinmenge, um eine Inaktivierung des Trypsins zu erreichen. Von der so gewonnenen Zellsuspension wurden 100 µl zur Zählung abgenommen (siehe 4.1.5.), der Rest wurde bei 200g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch neues Medium ersetzt, so wurde eine vollständige Entfernung des Trypsins erreicht. Die Zellsuspension wurde erneut gemischt und entsprechend der ermittelten Zellzahl auf neue Kulturflaschen verteilt.

4.1.4. Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension

Lösungen:

Trypanblaustammlösung: 400 mg Trypanblaugranulat

100 ml PBS (pH 7,4, Konz. 0,1M)

→ Konzentration Trypanblau 4 mmol/l

4. Methoden

Von der Trypanblaustammlösung wurden 900 µl mit 100 µl der beim Passagieren gewonnenen Zellsuspension vermischt und in eine Thomazählkammer pipettiert. Die in den beiden Zählrastern der Zählkammer befindlichen Zellen wurden ausgezählt und gemittelt. Nach folgender Formel wurde anschließend die Gesamtzellzahl errechnet.

$$\frac{(ZZ * V_M * f)}{V_T} \quad \text{bzw.} \quad \frac{(\text{Zellzahl} * 1000 \mu\text{l} * 10)}{0,064 \mu\text{l}} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

ZZ: Zellzahl

V_M: Volumen der zu zählenden Suspension (1000 µl)

f: Verdünnungsfaktor (10)

V_T: Volumen der Zählkammer über dem Zählraster (0,064 µl)

4.1.5. Einfrieren von Zellen

Lösungen:

Einfrieremedium: 10 ml Kulturmedium (4.1.2.)
800 µl DMSO

Zur Anlage eines Stammzellpools wurden die SVEC4-10 Zellen, die J774 Makrophagen und die SK-BR-3 Zellen bei möglichst niedriger Passagezahl eingefroren. Nach der Ernte und Auszählung der Zellen wurden 1×10^7 Zellen mit 1ml des auf 4 °C gekühlten Einfrieremediums vermischt. Die entstandene Zellsuspension konnte nun rasch auf die Einfrierröhrchen verteilt und diese in ein gekühltes, mit Isopropanol gefülltes, Einfriergefäß gestellt werden. In diesem Gefäß wurden die Zellen für 2 Tage bei -80 °C eingefroren. Das Isopropanol sorgte hierbei für eine gleichmäßige Abkühlung der Zellen. Anschließend erfolgte die weitere Aufbewahrung in der Stickstofftonne bei -196 °C.

4. Methoden

4.1.6. Kontrolle der Zellen auf Mycoplasmeninfektion mittels DAPI-Test

Lösungen:

DAPI-Stammlösung: 5 µg DAPI
1 ml Aqua dest.
→ Konzentration: 5 µg/ml

DAPI-Gebrauchslösung: 0,2 ml DAPI-Stammlösung
10 ml Methanol
→ Konzentration: 0,1 µg/ml

Die zu untersuchenden Zellen wurden in einem Chamber Slide (8 Kammern, Wachstumsfläche 0,8 cm²/Kammer, Volumen 400 µl pro Kammer) ausgesät. Die Kammern wurden mit 1x10⁵ Zellen und 400 µl Medium befüllt. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde das Medium abgenommen und der Zellrasen dreimalig mit 400 µl PBS gewaschen. Anschließend folgte ein Waschschrift mit 400 µl DAPI-Gebrauchslösung. Nun wurden die Zellen mit 400 µl DAPI-Gebrauchslösung abgedunkelt für 15 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte die Entfernung der DAPI-Gebrauchslösung und das dreimalige Waschen mit 400 µl PBS. Jetzt konnte die Chamber Slide Begrenzung mit einem Skalpel vorsichtig abgetrennt werden. Der verbleibende Objektträger mit dem Zellrasen wurde mit einem befeuchteten Deckglas versehen. Die Auswertung des Testes erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop bei der DAPI-Anregungswellenlänge von 488 nm und einer 100 fachen Vergrößerung.

4.2. Grundlagen der angewandten Methoden

4.2.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Grundlage der Proteinbestimmung nach Bradford bildet der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250, dessen Absorptionsmaximum in Anwesenheit von Proteinen von 465 auf 595 nm verschoben wird. Die Absorptionzunahme ist hierbei ein Maß für die Menge an vorhandenem Protein in der Lösung (Bradford, 1976).

4. Methoden

Für die Proteinbestimmung wurde eine Eichkurve mit einer Proteinstammlösung (0,5 µg BSA/µl) angefertigt. Unterschiedliche Mengen an Proteinstammlösung (0, 2, 5, 10, 15, 20 µl) wurden mit Aqua bidest. auf 100 µl aufgefüllt und mit 1 ml Bradfordreagenz versetzt. Es ergaben sich so verschieden konzentrierte Ansätze mit Proteinkonzentrationen von 0 bis 10 µg. Von den zu untersuchenden Proteinlösungen wurden 20 µl abgenommen, auf 100 µl mit Aqua bidest. aufgefüllt und mit 1 ml Bradfordreagenz versetzt. Alle Ansätze wurden dreifach hergestellt. Es erfolgte anschließend die Messung im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm. Dabei wurde die Absorption der Eichkurvenansätze und der unbekannten Proben gegen 1 ml Bradfordreagenz als Referenz gemessen. Von den ermittelten Absorptionswerten wurden die Mittelwerte gebildet und die Eichkurve erstellt. Die Proteinmenge der unbekannten Ansätze konnte aus der Eichkurve abgelesen werden.

4.2.2. Eisen- bzw. Eisenoxidbestimmung

Bei dem magnetischen Material, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, handelt es sich um magnetische Nanopartikel bzw. Ferrofluide. Ein Ferrofluid ist eine Suspension aus Nanopartikeln in einem flüssigen Medium. Die Nanopartikel bestehen ihrerseits aus einem Eisenoxidkern, der von einer bioverträglichen Carboxymethyldextranhülle umgeben wird. Diese Hülle ermöglicht die Suspension der Partikel in einem flüssigen Medium.

In allen eingesetzten Ferrofluiden (siehe 4.3. Tabelle 1) wurde die Eisenkonzentration vor der Verwendung in Experimenten bestimmt. Über die Bestimmung der Eisenmenge konnte ebenfalls, als Endpunkt aller Experimente, die an Zellen gebundene Menge magnetischen Materials abgeschätzt werden. Die Analyse dieser Eisengehalte (einzelne Ferrofluide bzw. Proben der Experimente) wurde im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) durchgeführt. Dieses Verfahren dient der quantitativen Analyse von Elementen in atomarisierte Form. Man macht sich hierbei die Fähigkeit der Atome zu nutze, einen charakteristischen Bereich der Lichtenergie zu absorbieren.

Da die Nanopartikel bzw. Ferrofluide nicht nur aus Eisen, sondern aus Eisenoxid bestehen, war es erforderlich aus den ermittelten Eisengehalten die Eisenoxidmasse

4. Methoden

zu berechnen. Aus Untersuchungen ist bekannt, dass der Eisenoxiddkern der Ferrofluide zu 90% aus Maghemit ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) und zu 10 % aus Magnetit (Fe_3O_4) besteht (Kießling, 2002; Hergt R., persönliche Mitteilung). Um die Eisenoxidmassen-Berechnung zu vereinfachen, wurde der geringe Anteil an Magnetit vernachlässigt und der Maghemit Anteil gleich 100% gesetzt. So konnte mit der ermittelten Eisenmasse nach folgender Formel (1) (Kießling, 2002) die entsprechende Sauerstoffmasse des Eisenoxid im definierten Volumen Ferrofluid näherungsweise berechnet werden.

$$(1) \quad \frac{m_{\text{O}}}{m_{\text{Fe}}} = \frac{M_{\text{O}} \cdot n_{\text{O}}}{M_{\text{Fe}} \cdot n_{\text{Fe}}} \rightarrow m_{\text{O}} = \frac{M_{\text{O}} \cdot n_{\text{O}} \cdot m_{\text{Fe}}}{M_{\text{Fe}} \cdot n_{\text{Fe}}}$$

M_{O} → Molare Masse von Sauerstoff ($M_{\text{O}} = 15,999 \text{ g/mol}$)

M_{Fe} → Molare Masse von Eisen ($M_{\text{Fe}} = 55,85 \text{ g/mol}$)

n_{O} → Stoffmenge von Sauerstoff im Molekül Fe_2O_3

n_{Fe} → Stoffmenge von Eisen im Molekül Fe_2O_3

m_{Fe} → Masse von Eisen (ermittelt durch AAS)

m_{O} → Masse von Sauerstoff

Mit den ermittelten Massen von Eisen und Sauerstoff lässt sich die Masse des Eisenoxids (Maghemit) für ein bestimmtes Volumen des Ferrofluids über folgende Formel (2) (Kießling, 2002) berechnen.

$$(2) \quad m_{\text{Fe}_2\text{O}_3} = m_{\text{O}} + m_{\text{Fe}}$$

$m_{\text{Fe}_2\text{O}_3}$ → Masse von Maghemit im definierten Ferrofluidvolumen

m_{Fe} → Masse von Eisen (AAS - Bestimmung)

m_{O} → Masse von Sauerstoff (Berechnung mit Formel (1))

4. Methoden

4.3. Darstellung der verwendeten Magnetischen Nanopartikel

Die in dieser Arbeit verwendeten Ferrofluide und ihre Eigenschaften sind in Tabelle 1 dargestellt. Die hydrodynamischen Teilchdurchmesser sind nach Herstellerangaben aufgeführt, die Eisen- bzw. Eisenoxidgehalte wurde mittels AAS bestimmt bzw. errechnet (4.2.2.). Eine Besonderheit findet sich bei der Hüllenzusammensetzung des magnetischen Materials P1, P2 und P3 aus Greifswald, bei denen Streptavidinmoleküle Bestandteile der Hülle sind.

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Ferrofluide mit ihren Eigenschaften. Die dargestellten Eisengehalte der Ferrofluide wurden mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt, die Eisenoxidkonzentrationen konnten aus den Eisengehalten mit der unter 4.2.2. beschriebenen Formel errechnet werden. Die hydrodynamischen Teilchendurchmesser entstammen Herstellerangaben. Als Besonderheiten finden sich neben den Carboxymethyldextranhüllen der Partikel B1 und V123, an die Carboxymethyldextranhüllen der Partikel P1,P2,P3 Streptavidinketten gekoppelt.

Bezeichnung des Ferrofluids	Eisengehalt	Eisenoxidgehalt	Hydrodynamischer Teilchendurchmesser
B 1 Weitschies/ Greifswald	56 g/l	80 g/l	50 nm
P1 Weitschies/ Greifswald	0,49 g/l	0,70 g/l	73 nm
P2 Weitschies/ Greifswald	0,353 g/l	0,50 g/l	84 nm
P3 Weitschies/ Greifswald	0,40 g/l	0,58 g/l	85 nm
V123 Innovent/ Jena	83,38 g/l	119,21 g/l	150 nm

4.4. Untersuchungen zur unspezifischen Bindung

Zur unspezifischen Bindung von magnetischen Nanopartikeln an phagozytierende Makrophagen wurde das native Ferrofluid B1 aus Greifswald verwendet. Um die Sterilität der Partikel sicher zu stellen, wurden diese bei 121 °C für eine halbe Stunde autoklaviert. Es erfolgte daraufhin eine erneute Bestimmung des Eisen bzw. Eisenoxidgehaltes im Ferrofluid wie unter 4.2.2. beschrieben.

4. Methoden

Das Ferrofluid B1 wurde auf die adhären wachsenden Makrophagen gegeben und diese damit für 2, 4, 8 und 12h inkubiert. Hierfür wurden 5 Versuchsansätzen mit gleicher Anzahl an Makrophagen auf Zellkulturflaschen ausgesät und für 3 Tage bebrütet. Ein Ansatz wurde anschließend zur Ermittlung der Ausgangszellzahl t_0 verwendet. Die 4 anderen Versuchsansätze wurden vom Medium befreit und mit PBS gewaschen. Auf den Zellrasen wurden jetzt jeweils 70 μ l des Ferrofluids B1 gegeben. Diese Menge wurde empirisch festgelegt, um den Zellen eine ausreichende Eisenoxidquelle bieten zu können. Auf den Zellrasen wurden 5 ml Medium hinzugefügt und die Flaschen für die festgelegten Zeitintervalle (2, 4, 8 und 12h) inkubiert. Danach wurden die Flaschen aus dem Inkubator genommen und die Zellen unter dem Mikroskop beurteilt. Die Zellen wurden vom ferrofluidhaltigem Medium befreit und 5 mal mit PBS gewaschen, um nicht an die Zellen gebundenes, freies Ferrofluid zu entfernen. Die Ablösung der adhären Makrophagen vom Flaschenboden wurde nun mittels Zellschabern durchgeführt, da die Anwesenheit des Ferrofluids den enzymatischen Ablösevorgang mit Trypsin/EDTA behinderte. Jetzt konnten die Zellen in 5 ml Medium aufgenommen und in einen Falcontube gegeben werden. Es wurde nun die Zellzahl für jede Inkubationszeit (t_{2h} , t_{4h} , t_{8h} und t_{12h}) ermittelt (4.1.4.). Danach wurden die Zellsuspensionen nochmals 3 mal mit 1 ml PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellpellet in 200 μ l PBS gelöst. Als Kontrollen, zur Analyse des nativen Eisengehaltes der Makrophagen, dienten für jeden Versuchansatz Makrophagen ohne magnetisches Material, die mit der entsprechenden Zellzahl in 200 ml PBS gelöst wurden. Abschließend wurde in allen Proben der Eisengehalt in den Zellsuspensionen bestimmt und die Eisenoxidkonzentration daraus errechnet (4.2.2.). Es wurden insgesamt 3 unabhängige Experimente mit den Makrophagen durchgeführt.

4.5. Untersuchungen zur spezifischen Bindung

Zur spezifischen Bindung von magnetischen Nanopartikeln (MNP) an die Zellen war das Vorhandensein eines geeigneten Oberflächenrezeptors entscheidend, um die spezifische antikörpervermittelte Bindung des magnetischen Materials an die Zellen erzielen zu können. Hierbei fanden 2 Zellmodelle (Endothelzell- und Tumorzellmodell) mit ihren Rezeptoren Anwendung.

4. Methoden

Im Endothelzellmodell wurde der CD106-Rezeptor auf den SVEC4-10 Zellen als Modellantigen verwendet. Dieser Rezeptor wird von den SVEC4-10 Zellen konstant auf der Oberfläche ausgebildet und kann, nach Untersuchungen von Keil (2003), durch TNF α in seiner Expression gesteigert werden.

Das Modellantigen im Tumorzellmodell stellte der Her-2/neu-Rezeptor dar, der auf der Oberfläche von SK-BR-3 Zellen expremiert wird. Die Expression des Rezeptors wurde hierbei nicht beeinflusst.

4.5.1. Rezeptorexpression im Endothelzell- und Tumorzellmodell

4.5.1.a. Das Endothelzellmodell

Lösungen: Steriles PBS (pH 7,4; Konz. 0,1 M)
TNF α Stammlösung (10 μ g/ml)

Die Expressionssteigerung des CD106-Rezeptors auf der SVEC4-10 Zelloberfläche wurde unter dem Einfluß von TNF α erreicht. Die SVEC4-10 Zellen wurden ausgesät (Zellzahl 7×10^6) und für 24h im Brutschrank inkubiert. Die hohe Zellzahl war erforderlich, da die anschließende TNF α Behandlung das Wachstum der Zellen verlangsamte, und eine hohe Ausbeute an Zellen nach 48h Inkubation für die Versuche nötig war. Nach einer 24 stündigen Wachstumszeit erfolgte die mikroskopische Beurteilung der Zellen und die Stimulation mit TNF α . Hierfür wurde eine TNF α Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 1 μ g/ml hergestellt. Zur Stimulation der Zellen wurden 30 ng TNF α pro ml Medium für 24 Stunden unter Standardkulturbedingungen auf die Zellen gegeben. Dies entsprach bei 20 ml Medium einer TNF α Menge von 600 ng bzw. 600 μ l TNF α Gebrauchslösung. Nach der Stimulation konnten die Zellen für die Experimente verwendet werden.

4.5.1.b. Das Tumorzellmodell

Die Steigerung der Her-2/neu-Rezeptoren auf den SK-BR-3 Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Die Zellen konnten ohne Stimultionsbehandlung für die Experimente verwendet werden.

4.5.2. Kontrolle der Rezeptorexpression der Zelllinien mittels FACS Analyse

Der Nachweis der Expression der Rezeptoren auf den verwendeten Zellen erfolgte mittels FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) Analyse. Hinter dem Begriff FACS verbirgt sich ein Verfahren, das unter anderem zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenrezeptoren angewandt wird. Grundlage hierbei bilden Antigen-Antikörper-Reaktionen mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern (Toxikologie, Uni Mainz, 2003). In den durchgeführten Experimenten dienten Alexa Fluor 488 und CY 5.5 als Fluoreszenzfarbstoffe.

Der Nachweis der Expression des CD106-Rezeptors auf den SVEC4-10 Zellen erfolgte hierbei mit einer indirekten Methode. Bei dieser indirekten Methode wird der fluoreszenzmarkierte Antikörper nicht direkt an den Rezeptor gebunden. Für die Rezeptorbindung wird ein primärer Antikörper verwendet. An diesen erfolgte dann die Kopplung des fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers.

Die Oberflächenrezeptoren der SVEC4-10 Zellen wurden hierbei mit den primären CD106-Antikörpern besetzt, zum Nachweis der unspezifischen Bindung der Antikörper an die Zelloberfläche wurden primäre IgG1 κ -Isotyp-Antikörper verwendet. Diese primären Antikörper wurden mit den Alexa Fluor 488 gekoppelten sekundären Antikörpern markiert.

Der Nachweis der Her-2/neu-Rezeptoren auf der Oberfläche der SK-BR-3 Zelllinie wurde als direkte Methode geführt. Bei dieser Methode wurde ein mit dem Fluorochrom CY5.5 markierter Her-2-Antikörper eingesetzt, der sowohl an die Oberflächenrezeptoren der Zellen bindet als auch fluoresziert. Ebenfalls wurde ein Isotyp-Antikörper mit dem Fluorochrom markiert und in einem Schritt an die Zellen gebunden.

Die Messungen erfolgten am FACS Gerät, ebenso die Auswertungen der Ergebnisse mit einer speziellen Software.

4. Methoden

4.5.2.a. Kontrolle der Rezeptorexpression im Endothelzellmodell

Lösungen: FACS Puffer (PBS (pH 7,4; Konz.0,1 M) mit 1 % BSA)
CD106- bzw. Isotyp-Antikörper (rat anti mouse, Konzentration 0,5 µg/µl)
Alexa 488-Antikörper (anti rat, Konzentration 0,5 µg/µl)

Für die FACS Untersuchung der CD106-Rezeptorexpression auf SVEC4-10 Zellen (siehe auch 4.2.1.) wurden jeweils 1×10^6 mit TNF α stimulierte Zellen und 1×10^6 unstimulierte Zellen für die spezifische (CD106-Antikörper) und unspezifische (Isotyp-Antikörper) Markierung verwendet. Die primären CD106- bzw. IgG1 κ -Antikörper wurden in FACS Puffer gelöst (Endkonzentration 2µg/ 1×10^6 Zellen), auf die Zellen gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze 3 mal mit FACS Puffer gewaschen. Nach dem Waschen erfolgte die Inkubation der Zellen mit den sekundären Alexa Fluor 488 markierten Antikörpern (Endkonzentration 1µg/ 1×10^6 Zellen) für 30 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit. Nach dieser Zeit wurden die Zellen 3 mal mit FACS Puffer gewaschen und abschließend in 500 µl FACS Puffer aufgenommen. Jetzt erfolgte die Messung am FACS Gerät und die Auswertung der ermittelten Meßergebnisse.

4.5.2.b. Kontrolle der Rezeptorexpression im Tumorzellmodell

Lösungen: FACS Puffer (PBS (pH 7,4; Konz.0,1 M) mit 1% BSA)
Herceptin-Antikörper + CY 5.5 (Konzentration 0,2 µg/µl)
Isotyp-Antikörper + CY 5.5 (Konzentration 0,64 µg/µl)

Die FACS Analyse der SK-BR-3 Zellen wurde mit jeweils 1×10^6 Zellen für die spezifische (Herceptin) und unspezifische (Isotyp) Bindung durchgeführt. Die 1×10^6 SK-BR-3 Zellen wurden in 500 µl FACS Puffer gelöst und mit 25 µl CY5.5-gekoppelten-Herceptin-Antikörper oder CY5.5-gekoppelten-Isotyp-Antikörper für 30 min bei Raumtemperatur und in Dunkelheit behandelt. Anschließend wurden die Zellen 3 mal mit FACS Puffer gewaschen, in 500 µl FACS Puffer aufgenommen und die Messung am FACS Gerät durchgeführt.

4.5.3. Spezifische Bindung von Ferrofluiden an Endothelzellen mit der Mehrschrittmethode (Two Step Methode)

Lösungen: Separationspuffer (SP) (PBS (pH 7,4; Konz. 0,1 M) + 2 mM EDTA + 0,5% biotinfreies BSA, pH 7,2)
Biotinylierte CD106-Antikörper (rat anti mouse, Konzentration 0,5 µg/µl)
Biotinylierte Isotyp-Antikörper (IgG1κ, rat anti mouse, Konzentration 0,5 µg/µl)
Ferrofluide P1, P2 und P3 mit Streptavidin (Eisenkonzentration siehe Tabelle 1 unter 4.3.)

Im Rahmen der Untersuchung zur spezifischen Bindung von Ferrofluiden an Zellen stand der CD106-Rezeptor auf der Oberfläche der SVEC4-10 Zellen unter Verwendung der Mehrschrittmethode im Vordergrund. Bei dieser Methode wurden zunächst in einem ersten Schritt die spezifisch bindenden, biotinylierte CD106-Antikörper an die CD106-Rezeptoren gekoppelt. In einem zweiten Schritt wurde über die Biotin Gruppen der Antikörper die Kopplung der streptavidinhaltigen magnetischen Nanopartikel vermittelt. Die bindungsvermittelnden Moleküle Biotin und Streptavidin, die auch als Brückenmoleküle bezeichnet werden, wurden also im Rahmen der Mehrschrittmethode nacheinander, an Antikörper bzw. Ferrofluid gebunden, zu den Zellen gegeben. Sie ermöglichten somit eine Bindung des Ferrofluids über den Antikörper spezifisch an die SVEC4-10 Zellen. In Abbildung 2 sind die Komponenten dieser Bindung schematisch dargestellt.

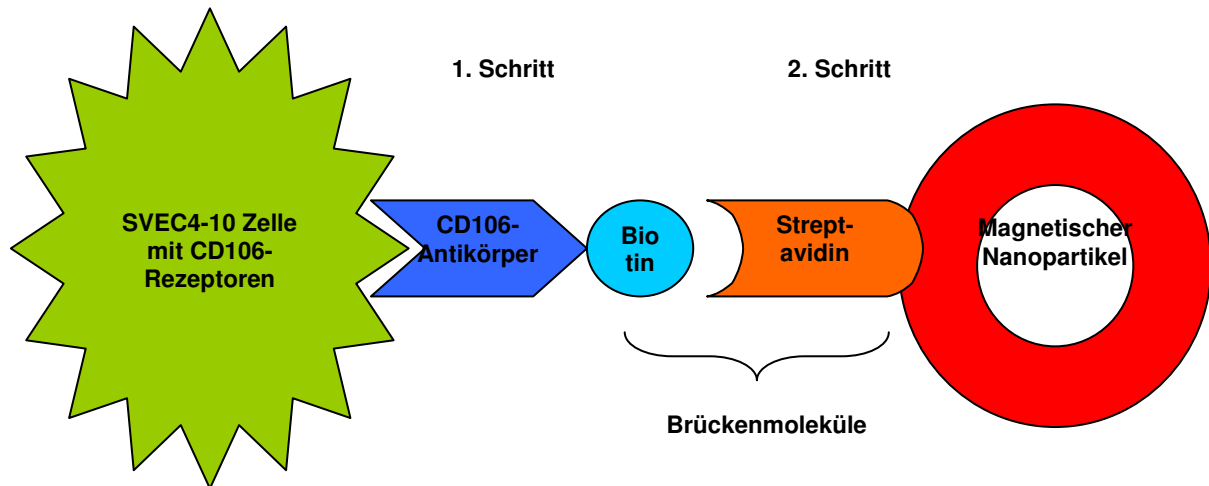


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Bindung eines biotinylierten Antikörpers und eines streptavidinhaltigen Magnetischen Nanopartikels an eine SVEC4-10 Zelle im Rahmen der Mehrschrittmethode. Grün: SVEC4-10 Zelle mit ihren CD106-Rezeptoren; Blau: CD106-Antikörper mit der Biotin-Komponente; Rot: Magnetischer Nanopartikel mit einem Streptavidinmolekül.

Zur Durchführung der Experimente mit der Mehrschrittmethode wurden die SVEC4-10 auf Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 160 cm² ausgesät und für 24 Stunden unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Nach 24h wurde bei einem Teil der Zellen die Rezeptorstimulation mit TNF α wie unter 4.5.1.a. beschrieben über 24h durchgeführt. Ein anderer Teil der Zellen wurde nicht stimuliert und konnte ebenfalls nach weiteren 24h für Kontrollen genutzt werden. Nach 48h wurden alle die Zellen geerntet, gewaschen und gezählt. In jedem Experiment wurden 4 Versuchsansätze parallel analysiert. In 3 Ansätzen wurden stimulierten SVEC4-10 Zellen mit Antikörpern und Ferrofluid bearbeitet. In einem Ansatz wurden unstimulierte Zellen unbehandelt, d.h. zur Kontrolle der nativen Eisenmenge in den Zellen, mitgeführt. Die Zellzahl lag zwischen 8x10⁶ und 10x10⁶ Zellen. Die stimulierten Zellen wurden mit 300 μ l Separationspuffer (SP) versetzt und mit den Antikörpern (1 μ g AK auf 1x10⁶ Zellen) inkubiert. Die Inkubationszeiten betrugen 30min, 60min und 90min bei einer Temperatur von 37°C. Die Zellen wurden hierbei auf einem Mixer langsam bewegt, um eine Sedimentation zu verhindern. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Zellen 3 mal mit Separationspuffer gewaschen und bei 4°C zentrifugiert, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die Kühlung sollte hierbei Endozytoseprozesse verringern. Abschließend wurde das Zellpellet in 85 μ l Separationspuffer aufgenommen. Nun wurden zu jedem Ansatz 15 μ l der Streptavidin gekoppelten magnetischen Nanopartikel zugefügt. Die

4. Methoden

Konzentration an Eisenoxid im Ferrofluid schwankte in Abhängigkeit von der Charge und lag zwischen 7,5 µg/µl und 10 µg/µl. Die Inkubation mit dem Ferrofluid erfolgte für 30, 60 und 90min bei 37°C unter leichtem Schütteln. Nach der Behandlung mit den Nanopartikeln wurden die Zellen 3 mal mit Separationspuffer gewaschen und zentrifugiert. Der letzte Überstand nach der Zentrifugation wurde abgenommen und zum Nachweis von freiem Eisen im Ansatz mittels AAS untersucht.

Das Zellpellet wurde nun in 500 µl Separationspuffer aufgenommen und über eine Miltenyi-Separationssäule gegeben, um die magnetisch markierten von den unmarkierten Zellen zu trennen (siehe Methode 4.5.4). Anschließend wurden die markierten Zellen nochmals zentrifugiert und in 100 µl Separationspuffer aufgenommen. Eine Kontrolle aus unstimulierten und unbehandelten Zellen wurde ebenfalls in 100 µl Puffer gelöst.

In einer weiteren Untersuchungsreihe wurden die Parameter der Endothelzellbehandlung mit dem CD106-Antikörper verändert. Sie wurde für alle 3 Untersuchungsansätze auf 30 min bei 37°C festgelegt. Durch die Verkürzung und die Vereinheitlichung der Behandlungsdauer mit dem Antikörper auf 30 min bei 37°C in allen 3 Ansätzen sollte der Einfluss der Inkubationszeit und damit verbundenen Endozytosevorgänge analysiert werden. Die Behandlung mit dem streptavidinhaltigen Ferrofluid wurde nicht verändert. Eine Variation der Antikörperbehandlung in einer weiteren Versuchsreihe war die Inkubation der SVEC4-10 Zellen für 30min bei 4°C mit dem CD106-Antikörper. Hierbei galt es, neben dem zeitlichen Aspekt, auch den Einfluss der Temperatur auf die zellulären Aufnahmeprozesse zu untersuchen. Die Ferrofluidbehandlung blieb hierbei ebenfalls unverändert.

Als Kontrollen für alle vorher genannten Untersuchungen dienten Experimente mit einem Isotyp-Antikörper. Der Isotyp-Antikörper ist ein Antikörper gleichen Typs, der sich von dem CD106-Antikörper darin unterscheidet, dass er die spezifisch an den Rezeptor bindende Domäne nicht besitzt. Mit diesem Antikörper lässt sich also eine Aussage über die Spezifität der Antikörperbindung machen. In den Untersuchungen waren alle Parameter zu denen der beschriebenen Versuchsansätze vergleichbar, bis auf dass der CD106-Antikörper durch den Isotyp-Antikörper ersetzt wurde.

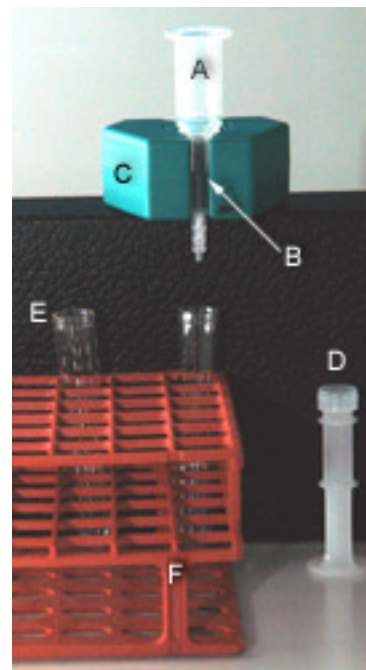
4. Methoden

4.5.4. Trennung von magnetisch markierten von nicht markierten Zellen mit der Miltenyi Separationssäule

Nach der Behandlung der Zellen mit den MNP erfolgte die Trennung der nicht magnetisch markierten von den magnetisch markierten Zellen. Die Separation erfolgte mit der Magnetseparationssäule von Miltenyi (Abbildung 3). Die Säule besitzt eine Matrix aus Eisenkugeln und wird mit dieser in einem Permanentmagneten platziert. Dieser Magnet erzeugt ein starkes Magnetfeld, durch welches alle magnetischen Teilchen, in unserem Falle alle mit magnetischen Nanopartikeln beladenen Zellen, in der Matrix festgehalten werden, alle Teilchen ohne magnetische Markierung passieren die Matrix der Säule.

In den durchgeführten Versuchen wurde die Säule im Permanentmagneten platziert und einmal mit Separationspuffer gespült, danach wurde die Zellsuspension ($8 \cdot 10^6$ SVEC4-10 Zellen in 500 µl Puffer) auf die Säule gegeben. Nach dreimaligem Spülen der Säule mit Puffer wurde diese mit 1 ml Puffer aufgefüllt und aus dem Magneten entfernt. In Abwesenheit des Magnetfeldes ließen sich die markierten Zellen mit einem Stempel aus der Säulenmatrix entfernen und konnten weiter verwendet werden. Die unmarkierten Zellen, die aus der Matrix gespült wurden, konnten aufgefangen und ausgezählt werden.

Abbildung 3: Versuchsaufbau zur Trennung von magnetisch markierten von unmarkierten Zellen mittels einer Miltenyi Separationssäule. A: Reservoir für die Zellsuspension; B: Ferromagnetische Matrix; C: Permanentmagnet; D: Stempel zum Auslösen der Zellen aus der Säulenmatrix; E: FACS Röhrchen zum Auffangen der unmarkierten bzw. markierten Zellen nach der Trennung; F: Ständer



4.5.5. Spezifische Bindung magnetischer Nanopartikel an Zellen mit der Einschrittmethode (One Step Methode)

Im Gegensatz zu den bisher durchgeführten Untersuchungen mit der Mehrschrittmethode, bei der die Antikörper im ersten und das Ferrofluid im zweiten Schritt zu den Zellen gegeben wurde, konnte bei der Einschrittmethode die Zugabe in einem Schritt vollzogen werden. Dafür war jedoch eine vorherige Kopplung der Komponenten, d.h. der Antikörper und der magnetischen Nanopartikel notwendig. Die aus den Kopplungen entstandenen Produkte wurden in dieser Arbeit als Sonden bezeichnet. Hierbei wurden verschiedene Sonden hergestellt. Zum einen wurden die biotinylierten CD106-Antikörper mit den streptavidinhaltigen magnetischen Nanopartikeln über ihre bereits beschriebenen Brückenmoleküle miteinander verbunden. Diese Sonde wurde daher als CD106-Brückenmolekül-Sonde bezeichnet und für die Untersuchungen an Endothelzellen eingesetzt. Eine weitere Sonde für Experimente am Endothelzellmodell wurde durch chemische Bindung von nicht biotinylierten CD106-Antikörpern und magnetischen Nanopartikeln hergestellt. Da diese Nanopartikel als Antikörper funktionalisierte Partikel bezeichnet werden, wurde diese Sonde als funktionalisierte CD106-Sonde bezeichnet. Im Rahmen der chemischen Bindung von Antikörpern an Nanopartikel konnte ebenfalls eine Sonde für das Tumorzellmodell erzeugt werden. Hierbei wurden Herceptin-Antikörper an magnetisches Material gekoppelt. Diese Sonde wurde funktionalisierte Her-2-Sonde genannt.

Zusammenfassend wurden folgende Sonden für die Versuche am Endothelzell bzw. Tumorzellmodell hergestellt: CD106-Brückenmolekül-Sonde, funktionalisierte CD106-Sonde, funktionalisierte Her-2-Sonde. Zur Verdeutlichung sind die Sondenunterschiede in Tabelle 2 aufgeführt.

4. Methoden

Tabelle 2: Dargestellt sind die verschiedenen Sonde für die Untersuchungen im Rahmen der Einschrittmethode. Hierfür wurden die zu Sonden gekoppelten Antikörper und Nanopartikeln in einem Schritt zu den entsprechenden Zellen gegeben. Die Tabelle zeigt die Bezeichnungen der Sonden, die Bindungsmechanismen der Komponenten und die in den einzelnen Sonden gebundenen Antikörper und Nanopartikel. Ebenso sind die Zielzellen der Sonden mit ihren Rezeptoren benannt.

Sonden	Kopplung über	Gebundener Antikörper	Gebundene Nanopartikel	Zielzellen
CD106-Brückenmolekül-Sonde	Brückenmoleküle Biotin-Streptavidin	Biotinyliert, CD106	Nanopartikel mit streptavidinhaltiger Carboxymethyldextran-hülle (P1,P2, Weitschies, Greifswald)	SVEC4-10 Endothelzellen mit CD106-Rezeptor
Funktionalisierte CD106-Sonde	Chemische Bindung	CD106	Nanopartikel mit Carboxymethyldextran-hülle (V123, Innovent, Jena)	SVEC4-10 Endothelzellen mit CD106-Rezeptor
Funktionalisierte Her-2-Sonde	Chemische Bindung	Herceptin	Nanopartikel mit Carboxymethyldextran-hülle (V123, Innovent, Jena)	SK-BR-3 Tumorzellen mit Her-2/neu-Rezeptor

4.5.5.1.a. Herstellung der CD106-Brückenmolekül-Sonde

Für diese Versuche mit der CD106-Brückenmolekül-Sonde war zunächst die Kopplung der Sondenkomponenten erforderlich. Hierbei wurden die biotinylierten CD106-Antikörper und die Streptavidin gekoppelten MNP aneinander gebunden. Zur Kontrolle der Bindungsspezifität des Antikörpers wurde ebenfalls eine Sonde mit einem Isotyp-Antikörper hergestellt. Die in Tabelle 3 beschriebenen Mengen an Antikörpern und Ferrofluid wurden mit Separationspuffer in Eppendorfcups gegeben und für 24h bei 4°C auf einem Mixer inkubiert. Danach wurden die nicht an die Nanopartikel gebundenen Antikörper mittels einer Miltenyi-Separationssäule abgetrennt (siehe 4.5.4.). Die Sonde (600 µl) konnte nun für die Experimente mit der Einschrittmethode eingesetzt werden.

4. Methoden

Tabelle 3: Darstellung der einzelnen Komponenten und deren eingesetzte Mengen zur Herstellung der Brückenmolekül-Sonden. Zur Herstellung der Sonde wurde die Antikörpermengen mit etwa 1µg Antikörper pro 1×10^6 Zellen angesetzt, im Experiment wurden 8×10^6 Zellen verwendet. Die Menge der Nanopartikel wurde empirisch festgelegt, ebenso das Gesamtvolumen der Sonde, welches durch die Zugabe von Separationspuffer auf 600 µl aufgefüllt wurde.

Brückenmolekül-Sonde	Menge CD106-Antikörper (Konz. 0,5 µg/µl)	Menge Isotyp-Antikörper (Konz. 0,5 µg/µl)	Menge Nanopartikel P1/P2 in µg/µl	Separationspuffervolumen in µl	Gesamtansatzvolumen in µl
1.CD106	9µg/18µl	—	84µg/120 µl P1 60µg/120 µl P2	462 µl	600 µl
2. Isotyp	—	9 µg/18 µl	60µg/120 µl P2	462 µl	600 µl

4.5.5.1.b. Magnetische Markierung der SVEC4-10 Zellen mit der Brückenmolekül-Sonde

Die Einschrittmethode mit der CD106-Brückenmolekül-Sonde wurde an stimulierten SVEC4-10 Zellen untersucht. Hierfür wurden 3 Ansätze mit jeweils 8×10^6 Zellen mit der Sonde bei 37°C für 30, 60 oder 90 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze 3 mal mit Separationspuffer gewaschen und bei 4°C zentrifugiert, um ungebundene Sondenmoleküle zu entfernen. Der letzte Überstand von jedem Ansatz wurde abgenommen und der Gehalt an freiem Eisen bestimmt. Die Trennung der mit Sonde markierten von den nicht markierten Zellen erfolgte mit der Miltenyi Separationssäule (siehe 4.5.4.). Die markierten Zellen wurden nochmals zentrifugiert, in 100 µl Puffer aufgenommen und der Eisengehaltbestimmung zugeführt. Mit einer Kontrolle aus 8×10^6 unstimulierten und unbehandelten Zellen, zur Ermittlung des nativen Eisengehaltes, wurde gleichermaßen verfahren. Es wurden ebenfalls Untersuchungen mit einer Isotyp-Brückenmolekül-Sonde unter den gleichen oben genannten Bedingungen, zur Untersuchung der Bindungsspezifität, durchgeführt.

4.5.5.2.a. Herstellung der funktionalisierten Sonden

Die Herstellung der funktionalisierten CD106- und Her-2-Sonden basiert auf der chemischen Aktivierung der Carboxylgruppen der Carboxymethyldextranhülle der verwendeten magnetischen Nanopartikel durch Carbodiimid (Carbodiimidmethode). Die Experimente zur Einschrittmethode unter Verwendung dieser funktionalisierten Sonden wurden für das Endothelzell- und das Tumorzellmodell durchgeführt. Zur Besetzung der Zielmoleküle, d.h. der Rezeptoren der Zellen (CD106- und Her-2/neu-Rezeptoren) wurden für die Sonden die entsprechenden Antikörper an die Nanopartikel gekoppelt. Ebenso wurden funktionalisierte Isotyp-Sonden hergestellt, mit denen die Spezifität der Bindung untersucht wurde. Die im Einzelnen verwendeten Komponenten und deren Mengen für die Sondenherstellung sind in Tabelle 4 dargestellt.

Für die Herstellung der funktionalisierten Sonden wurde zuerst die Kopplungsreagenz (EDC x HCL, N`ethyl-carbodiimidhydrochlorid) zu den Nanopartikeln (500 µl) pipettiert und dieser Ansatz für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Mixer inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte die Zugabe der je nach Sonde entsprechenden Antikörperlösung. Der gesamte Ansatz wurde für weitere 3h (Raumtemperatur, kontinuierliches Schütteln) inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf einen Magneten gestellt, um ungebundenen Antikörper abzutrennen. Die Partikel wurden anschließend 3 mal mit sterilem Wasser gewaschen und in 400 ml sterilem Wasser aufgenommen.

Zur Bestätigung des Kopplungserfolges bei der Produktion der verschiedenen Sonden, wurde bei allen Sonden eine Proteinbestimmung (siehe 4.4.5.2.) zur Ermittlung der gebundenen Antikörpermenge durchgeführt. Außerdem wurde der Eisengehalt der Sonden ermittelt.

4. Methoden

Tabelle 4: Darstellung der einzelnen Komponenten für die Herstellung der funktionalisierten CD106-, Her-2- und Isotyp-Sonden. Die zugesetzten Mengen an Kopplungsreagenz und Nanopartikeln wurden nach dem Kopplungsprotokoll für die Carbodiimidmethode gewählt. Die zugesetzten Antikörpermengen wurden empirisch gewählt.

Komponente	Name	Menge	Lösungs- mittel	Gesamt- menge
Kopplungsreagenz	N ^o ethyl- carbodiimidhydrochlorid EDC x HCL	8 mg	50 µl PBS	8mg/0,05ml pH = 5,3
Nanopartikel	V 123	200 µl	300 µl PBS	500 µl
Antikörper	CD106	30 µg	100 µl steriles Wasser	30µg/100µl
Antikörper	Isotyp (IgG1κ)	12,5 µg	100 µl steriles Wasser	12,5µg/100µl
Antikörper	Herceptin [®]	100 µg	100 µl steriles Wasser	100µg/100µl
Antikörper	Isotyp (IgG1κ)	12,5 µg	100 µl steriles Wasser	12,5µg/100µl

4.5.5.2.b. Magnetische Markierung von Endothel- und Tumorzellen mit funktionalisierten Sonden

Die Bindungsfähigkeit der funktionalisierten Sonden wurden in Experimenten sowohl an den Endothelzellen mit den CD106-Rezeptoren, als auch an den Tumorzellen mit den Her-2/neu-Rezeptoren untersucht.

Zur magnetischen Markierung von SVEC4-10 Zellen wurden in 2 Experimenten jeweils 3×10^7 und 5×10^7 Zellen mit der funktionalisierten CD106-Sonde inkubiert. Unter gleichen Bedingungen wurden die Zellen ebenfalls mit einer funktionalisierten Isotyp-Sonde, zur Untersuchung der Bindungsspezifität, behandelt. Als Kontrolle zur Ermittlung des nativen Eisengehaltes der Zellen wurden nicht stimulierte Zellen mit gleicher Zahl eingesetzt.

Die eingesetzte Sondenmenge lag bei 100µl (3×10^7 Zellen) und 120µl (5×10^7 Zellen) pro Versuchsansatz. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 30 min unter leichtem Schütteln. Nach der Inkubation wurden die Ansätze mehrfach gewaschen und bei 4°C zentrifugiert, um nicht gebundenes Sondenmaterial zu entfernen. Ebenfalls

4. Methoden

konnten Anteile der nicht an die Zellen gebundenen Sonden mit Hilfe eines Magneten aus den Proben entfernt werden. Diese zusammengelagerten Sondenpartikel, die auch als Agglomerate bezeichnet werden, wurden der Eisenbestimmung zugeführt. Die Proben wurden nochmals gewaschen und zentrifugiert, bis die bei der Zentrifugation entstandenen Überstände klar waren. Der letzte Überstand jedes Ansatzes wurde abgenommen und der Eisengehalt bestimmt. Die mit den funktionalisierten CD106- und Isotyp-Sonden behandelten Zellen wurden in 100 µl Separationspuffer aufgenommen und abschließend zur Eisengehaltbestimmung gegeben. Die Kontrolle aus unbehandelten Zellen wurde ebenfalls in 100 µl Puffer gelöst und der Eisengehalt bestimmt.

Für die Untersuchung an den SK-BR-3 Zellen wurden $6,25 \times 10^7$ Zellen in Separationspuffer gelöst und mit 100 µl der funktionalisierten Her-2- bzw. Isotyp-Sonden behandelt. Beide Versuchsansätze wurden für 30 min bei 37°C und leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mehrfach gewaschen. Somit wurden die ungebundenen Sondenanteile und Agglomerate abgetrennt. Diese und die entstandenen Überstände wurde zur Eisenbestimmung gegeben. Die behandelten Zellen wurden in 100 µl Puffer aufgenommen und der Eisengehalt bestimmt. Eine Kontrolle aus $6,25 \times 10^7$ unbehandelten SK-BR-3 Zellen in 100 µl Puffer wurde ebenfalls der Eisenbestimmung zugeführt.

4.6. Magnetische Wärmebehandlung der Zellen im Magnetwechselfeld

Die im Rahmen der Untersuchungen zur unspezifischen und spezifischen Bindung (Mehrschrittmethode und Einschrittmethode) entstandenen Ansätze aus magnetisch markierten Zellen wurden alle der magnetischen Wärmebehandlung zugeführt. Ebenfalls wurden alle unbehandelten Kontrollen im Magnetwechselfeld untersucht.

Die magnetische Wärmebehandlung der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Magnetfeldapplikators. Dieser besteht aus einer doppelwindigen Induktorspule mit einem Durchmesser von 9 cm und einem Generator. Zum Schutz vor Überhitzung diente ein Wasserkühlsystem. Charakteristisch für das erzeugte magnetische Wechselfeld war eine Frequenz von 410 kHz und eine Amplitude von 11 kA/m im Zentrum der Spule bei 50 prozentiger Generatorleistung (Hiergeist, persönliche Mitteilung, 2003). Zur Ermittlung der Temperatur wurde ein Thermoelement genutzt,

4. Methoden

welches aus zwei elektrischen Leitern unterschiedlichen Materials (Kupferdraht mit 0,09 mm im Durchmesser und Konstantandraht mit 0,16 mm im Durchmesser) bestand. Diese waren miteinander verdreht und an ihren Enden durch Lötstellen verbunden. Eine dieser Lötstellen wurde in der Probe platziert, die andere befand sich in einem Eiswassergemisch in einem isolierten Gefäß und diente als Referenz. Das Thermoelement war wiederum mit einem Multimeter verbunden. Dieses zeichnete die Spannungsveränderungen auf, die am Thermoelement infolge der Temperaturunterschiede zwischen der Probe und der Referenzlötstelle im Eiswasser entstanden. Die aufgezeichneten Spannungsveränderungen konnten vom Multimeter auf einen PC übertragen werden. Da die Spannungsveränderungen eine Funktion der Temperatur darstellten, ließen sie sich mit einer für das Thermoelement spezifischen Kalibrierungsgleichung (Frühau, 2002) in Temperaturen in °C umwandeln. Diese Temperaturen verdeutlichten die Wärmeentwicklung in der Probe und wurden in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

Für die Experimente war ein stabiler und reproduzierbarer Versuchsaufbau nötig, um für alle Messungen gleiche Bedingungen erzeugen und eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicherstellen zu können (Skizze zum Versuchsaufbau siehe Abbildung 4). Hierfür wurden die Probe und das Thermoelement, welches sich in einer Pasteupipette befand, im Zentrum der Spule genau zwischen den beiden Wendeln platziert. Um ein thermisches Gleichgewicht zwischen der Probe und dem Thermoelement zu erreichen, wurde eine 20 minütige Temperaturmessung ohne Magnetwechselfeld durchgeführt. Nach Erreichen des Gleichgewichtes konnte die Untersuchung mit zugeschaltetem MWF vorgenommen werden. Das Kühlsystem wurde ebenfalls hinzugeschaltet. Die Messung wurde mit 300 Meßzyklen und einem Meßintervall von 1 Sekunde gestartet. Zuerst wurden 50 Meßzyklen ohne Wechselfeld aufgezeichnet, dann wurde das MWF hinzugeschaltet und 150 Zyklen wurden gemessen. Nach dieser Zeit wurde das MWF wieder ausgestellt und die restlichen 100 Zyklen wurden aufgezeichnet. Die Auswertung der Daten erfolgte tabellarisch und graphisch. Zur Ermittlung der Temperaturdifferenzen wurden die Ausgangstemperaturen von den erreichten Endtemperaturen subtrahiert.

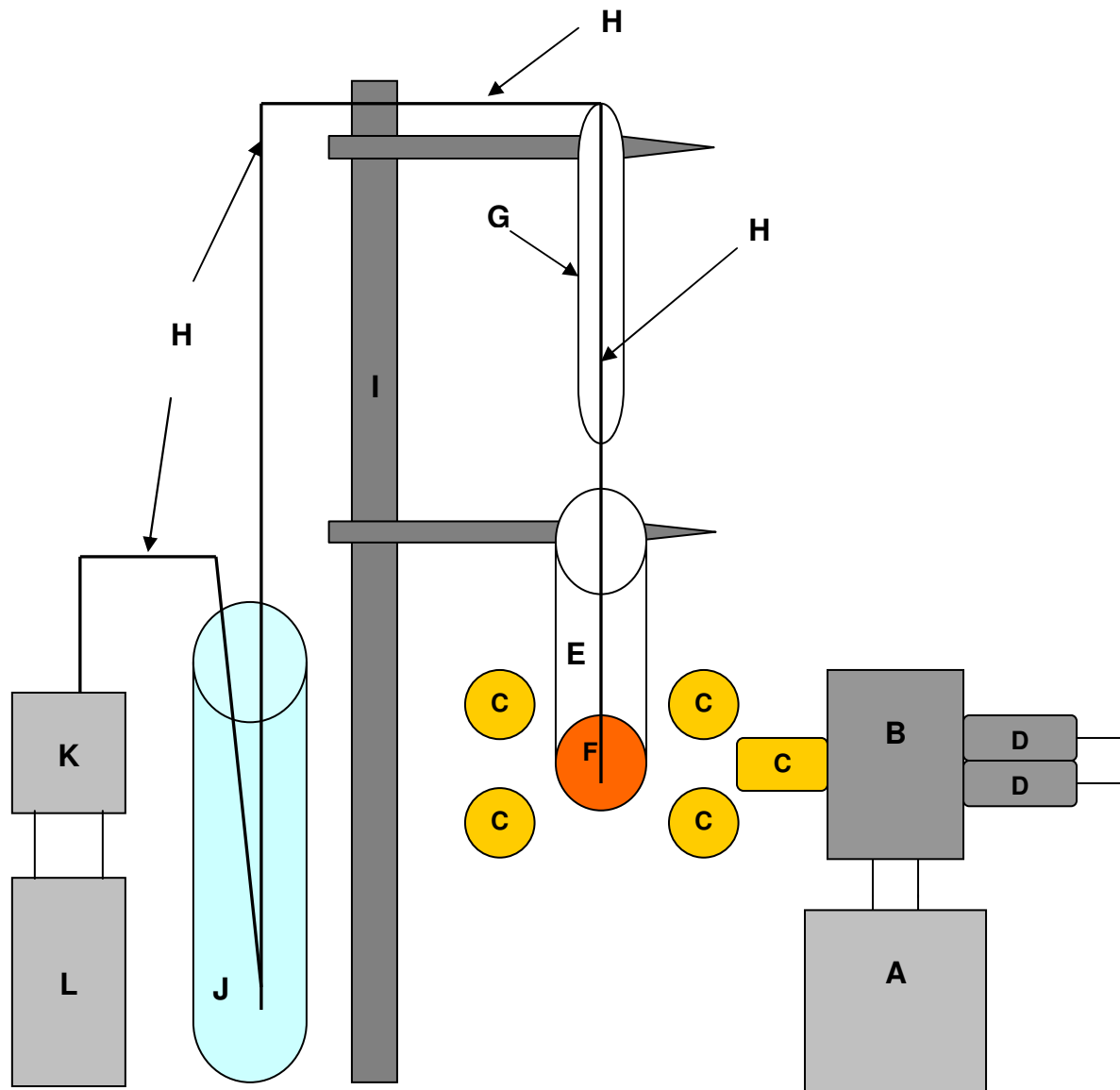


Abbildung 4: Skizze zum Versuchsaufbau der Messungen im magnetischen Wechselfeld zur Ermittlung der Wärmeentwicklung in den Proben.

A: Generator; B: Spulengehäuse; C: doppelwindige Spule; D: Kühlung; E: Facs-Röhrchen; F: Probe mit magnetischen Material; G: Pasteurpipette für Thermoelement; H: Thermoelement; I: Ständer mit Befestigungsarmen; J: Thermogefäß mit Eiswasser als Referenz; K: Multimeter für Thermoelement; L: Computer zur Datenauswertung.

5. Ergebnisse

5.1. Auswertung des DAPI-Tests

Die lichtmikroskopische Auswertung der DAPI-Tests zeigte, dass sowohl die Makrophagen als auch die SVEC4-10 Zellen und die SK-BR-3 Zellen mykoplasmenfrei waren. In den fluoreszenzmikroskopischen Betrachtungen der Zellen konnten die Zellkerne als scharf abgrenzbare, blau leuchtende, rundliche Gebilde dargestellt werden (Abbildung 5a und 5b). Spuren von Mycoplasmen DNA, als unscharf begrenzte, fadige Schweife um die Zellkerne wurden nicht entdeckt.

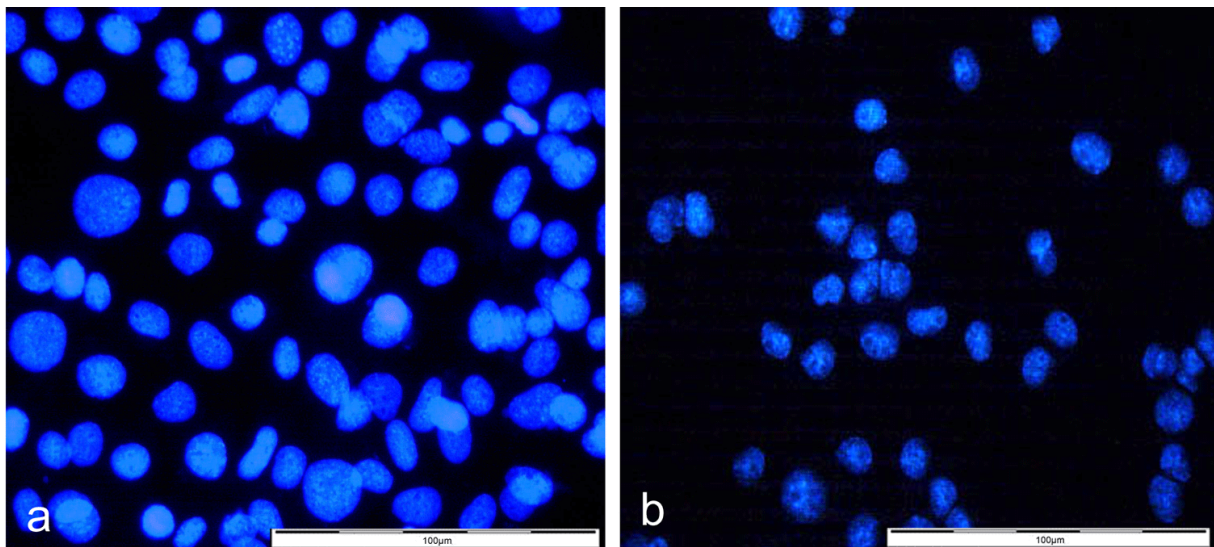


Abbildung 5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellen zur Auswertung des DAPI-Tests. Die Zellkerne der Zellen sind mit DAPI gefärbt und lassen sich scharf voneinander abgrenzen. a) Abbildung von gefärbten SVEC4-10; b) Darstellung von gefärbten Makrophagen. Auf die Abbildung von mit DAPI gefärbten SK-BR-3 Zellen wurde verzichtet. Messbalken 100 µm.

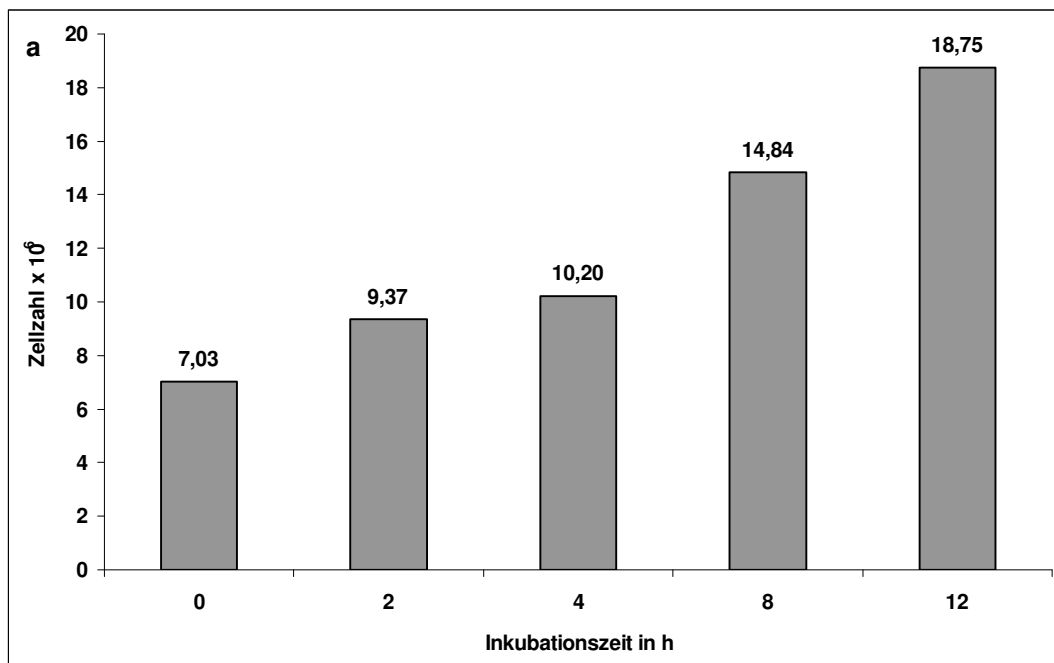
5.2. Unspezifische Bindung magnetischer Nanopartikel an Makrophagen

Die magnetische Markierung der Makrophagen erfolgte über 2, 4, 8 und 12 Stunden mit den magnetischen Nanopartikeln. Diese zeigten nach der Sterilisation eine Eisenkonzentration von 72,3 g/l. Die Eisenoxidskonzentration betrug daher 103,3 g/l. Die Untersuchungen zeigten eine Zunahme der Zahl an Makrophagen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (Abbildung 6a). Bei einer Ausgangszellzahl von

5. Ergebnisse

$7,03 \times 10^6$ unbehandelten Zellen konnte eine Steigerung der Zellanzahl von $9,37 \times 10^6$ Zellen nach 2h Inkubation mit dem Ferrofluid auf $18,75 \times 10^6$ Zellen nach 12h Inkubation verzeichnet werden. In zwei weiteren Wiederholungsexperimenten konnten ebenfalls vergleichbare Zellzahlen ausgezählt werden.

In den Versuchen konnte ebenso ein stetiger Anstieg der Eisenoxidkonzentration in den Makrophagen mit zunehmender Inkubationsdauer festgestellt werden (Abbildung 6b). Während die unbehandelten Zellen eine Eisenmasse von $0,18 \pm 0,10 \mu\text{g}$ zeigten, welche einer Eisenoxidmenge von $0,25 \pm 0,14 \mu\text{g}$ entsprach, lagen die Eisenoxidkonzentrationen in den Ansätzen der behandelten Makrophagen zwischen $146,35 \pm 103,85 \mu\text{g}$ nach 2h Behandlung mit den MNP und $839,61 \pm 569,89 \mu\text{g}$ nach 12h Inkubation. Dieser Anstieg konnte auch bei der Ermittlung der Eisenoxidmenge pro Zelle verzeichnet werden (Abbildung 6c). So konnte der Eisenoxidgehalt von $12,511 \pm 7,337 \text{ pg}$ pro Zelle nach 2h Behandlung auf $73,447 \pm 48,837 \text{ pg}$ nach 12h Inkubation mit den MNP gesteigert werden. Der Eisenoxidgehalt der unbehandelten Kontrolle lag hierbei bei $0,018 \pm 0,003 \text{ pg}$ pro Zelle.



5. Ergebnisse

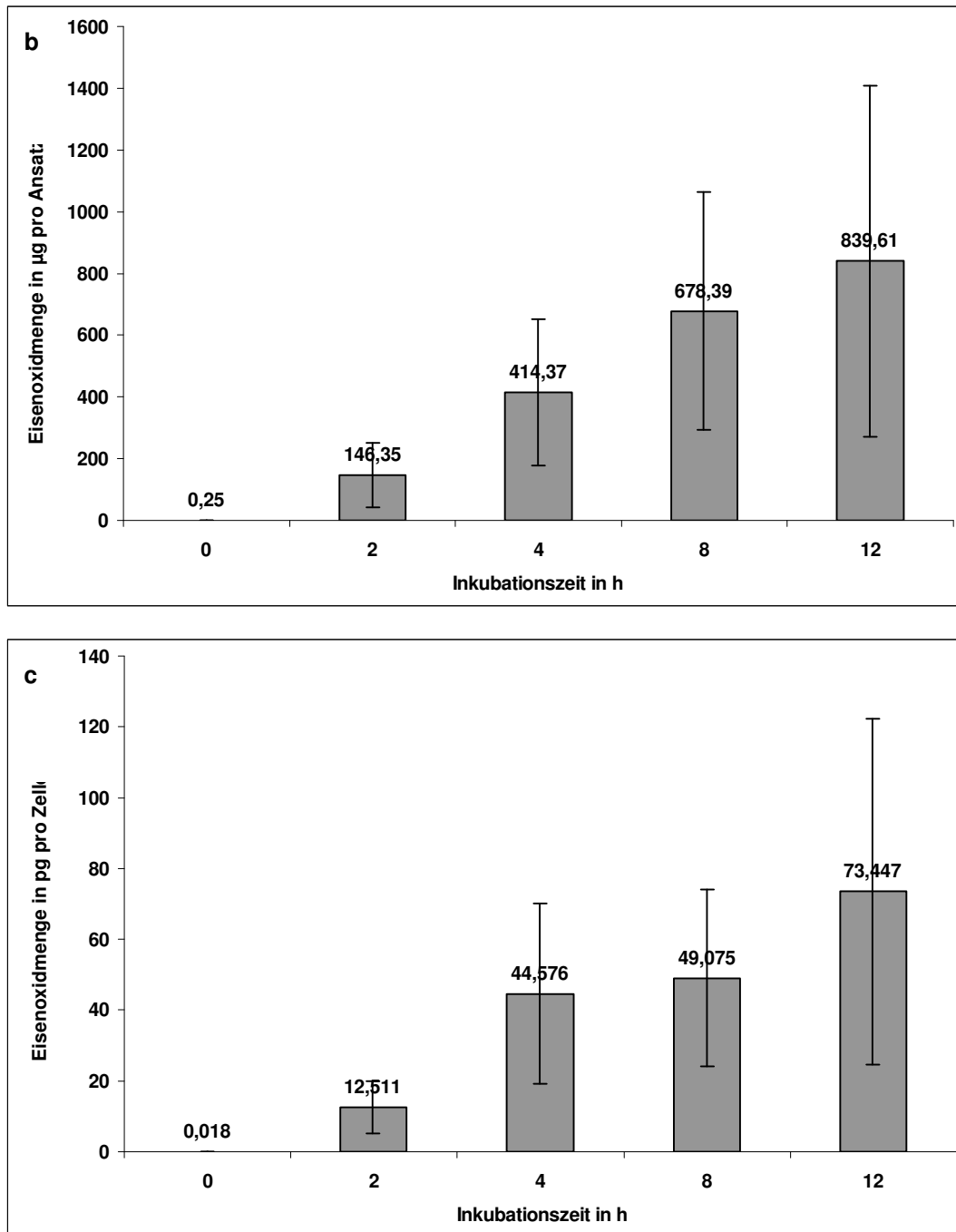


Abbildung 6: Dargestellt sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur unspezifischen Bindung von magnetischen Nanopartikeln an Makrophagen. Nach der Behandlung der Makrophagen für 2, 4, 8 und 12h mit dem magnetischen Material konnten sowohl Zellzahlen als auch Eisenoxidgehalt pro Ansatz und pro Zelle ermittelt werden. Ebenso wurden unbehandelte Zellen analysiert. a) Zellzahlen vor und nach Inkubation von Makrophagen mit magnetischen Nanopartikeln. Der 0h Wert stellt die Ausgangszellzahl vor Behandlung der Zellen mit Nanopartikeln dar. Die anderen Zellzahlen wurden nach den angegebenen Inkubationszeiten mit den Nanopartikeln bestimmt. Die Ergebnisse der Zellzählungen bestätigten sich in 2 Wiederholungsexperimenten. b) Eisenoxidgehalt pro Ansatz und c) Eisenoxidgehalt pro Zelle vor und nach Inkubation von Makrophagen mit Nanopartikeln. Der 0h Wert zeigt den Eisenoxidgehalt von nativen unbehandelten Makrophagen. Die anderen Werte spiegeln den Eisenoxidgehalt der Ansätze mit magnetisch markierten Makrophagen nach entsprechender Behandlungszeit wieder.

5.3. Spezifische Bindung von magnetischen Nanopartikeln an Zellen

5.3.1. FACS Untersuchungen zur Rezeptorexpression an den verwendeten Zellmodellen

Die FACS Analyse der SVEC4-10 Zellen verdeutlichte die Rezeptorexpression des CD106-Proteins auf der Zelloberfläche unter Einfluß der An- und Abwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ (24h Inkubationszeit). Die FACS Untersuchung zeigte die höchste Fluoreszenzintensität, die proportional zur Antikörperbindung an den Oberflächenrezeptor ist, nach der Behandlung von stimulierten SVEC4-10 Zellen mit CD106-Antikörpern (Abbildung 7 Kurve D). Die Fluoreszenzintensität nach Behandlung von unstimulierten Zellen mit CD106-Antikörpern war geringer (Abbildung 7 Kurve C). Die geringste Fluoreszenzintensität konnte nach der Inkubation von stimulierten und unstimulierten SVEC4-10 Zellen mit Isotyp-Antikörpern, die zur Analyse der Spezifität der Antikörperbindung dienten, erreicht werden (Abbildung 7 Kurven A und B). Ein Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen konnte hierbei nicht deutlich gezeigt werden.

Die Expression des CD106-Proteins auf der Oberfläche von SVEC4-10 Zellen lässt sich also durch die Anwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ positiv beeinflussen.

Die SK-BR-3 Zellen zeigten in der FACS Analyse eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität nach der Behandlung mit dem spezifisch an den Her-2/neu-Rezeptor bindenden Antikörper (Abbildung 8, Kurve B) als nach der Behandlung mit einem Isotyp-Antikörper (Abbildung 8 Kurve A). Die Expression des Her-2/neu-Proteins auf der Zelloberfläche lässt sich somit deutlich zeigen.

5. Ergebnisse

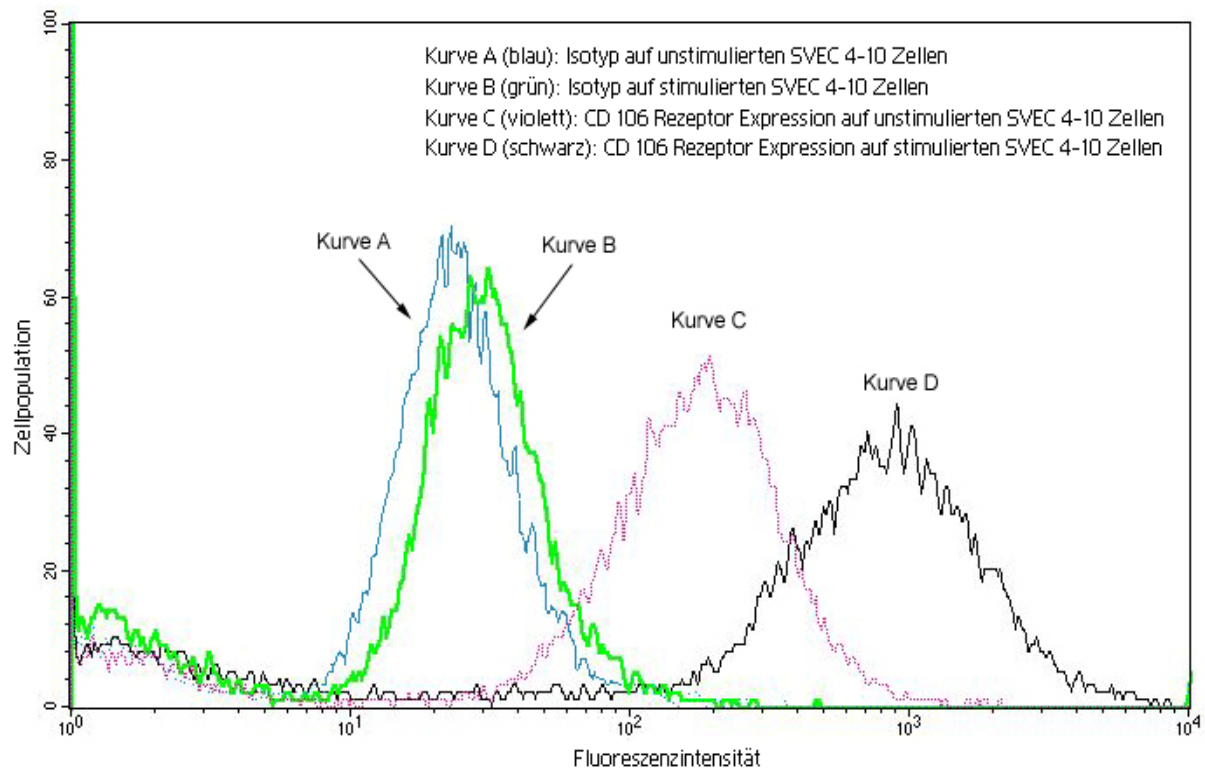


Abbildung 7: Nachweis der Expression des CD106-Rezeptors auf unstimulierten (violett) und stimulierten (30 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ über 24h; schwarz) SVEC4-10 Zellen mit der FACS Analyse. Der Rezeptornachweis erfolgte mit primären Antikörpern (CD106-AK) gegen die Rezeptoren und sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörpern (Alexa 488 markierte AK) gegen die primären Antikörper. Zur Untersuchung der Bindungsspezifität wurden stimulierte und unstimulierte Zellen ebenfalls mit einem primären Isotyp-Antikörper behandelt (blau und grün). Die Anregung des Fluorochroms erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 486\text{-}488\text{ nm}$, die Emission von Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda = 504\text{-}541\text{ nm}$. Die Fluoreszenzintensität ist auf der X Achse, die dazu untersuchte Zellpopulation ist auf der Y Achse aufgetragen.

5. Ergebnisse

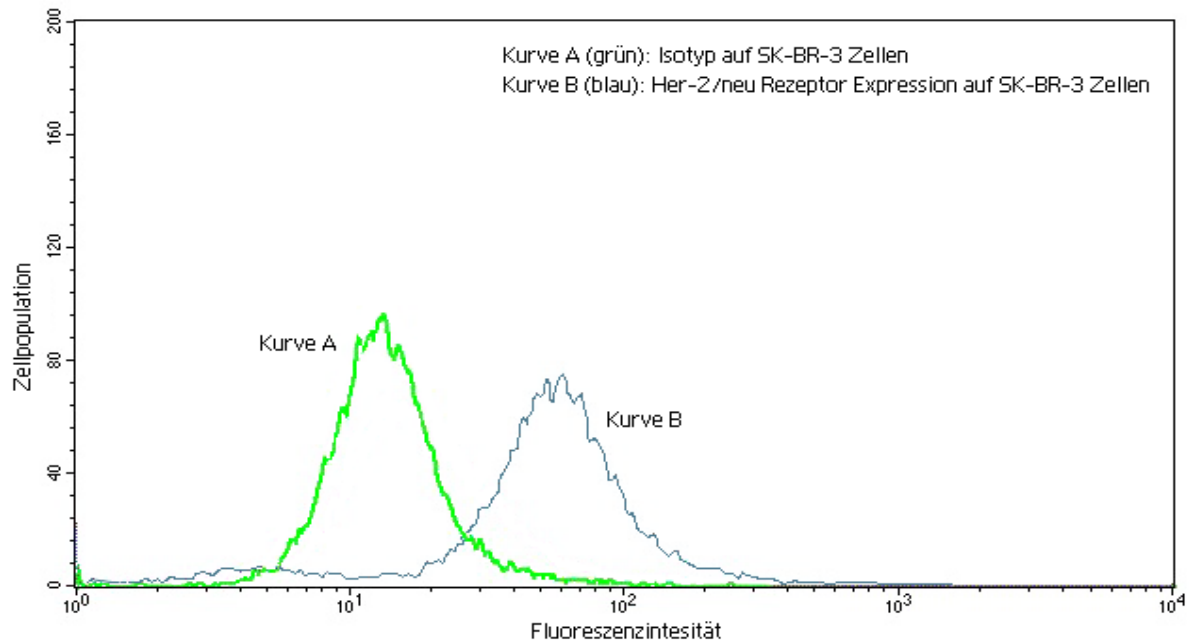


Abbildung 8: Nachweis der Expression des Her-2/neu-Rezeptors auf SK-BR-3 Zellen mit der FACS Analyse. Der Rezeptornachweis erfolgte mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (Her-2-AK markiert mit CY 5.5) gegen die Her-2/neu-Rezeptoren (blau). Zur Untersuchung der Bindungsspezifität wurden SK-BR-3 Zellen ebenfalls mit einem fluoreszenzmarkierten Isotyp-Antikörper behandelt (grün). Die Fluoreszenzintensität ist auf der X Achse, die dazu untersuchte Zellpopulation ist auf der Y Achse aufgetragen.

5.3.2. Magnetische Markierung von Endothelzellen mit der Mehrschrittmethode unter verschiedenen Kombinationen der Antikörper- und Ferrofluidinkubation

5.3.2.1. Zellmarkierung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit Antikörpern und Ferrofluid

Der Anteil der magnetisch markierten Zellen nach vorheriger Inkubation mit den CD106-Antikörpern für 30, 60 und 90 min und den Nanopartikeln für 30, 60 und 90 min bei 37 °C war in den beiden durchgeführten Versuchen stets hoch und lag nicht unter etwa 94 % (Tabelle 5). Im Vergleich hierzu lag der Anteil der markierten Zellen bei der Kontrolluntersuchung zur unspezifischen Bindung des Ferrofluids an die Zelloberfläche deutlich niedriger und zwar zwischen 60 und 80 % (Tabelle 5).

5. Ergebnisse

Tabelle 5: Dargestellt sind die Ausgangszellzahlen, sowie die Zahlen der magnetisch markierten (positiv Fraktion) und unmarkierten (negativ Fraktion) SVEC4-10 Zellen nach Inkubation der Zellen unter Anwendung der Mehrschrittmethode mit CD106-Antikörpern und magnetischen Nanopartikeln für jeweils 30/60/90 min bei 37 °C.

	1.Versuch: CD106-Antikörper und Nanopartikel			2.Versuch: CD106-Antikörper und Nanopartikel			Kontrollversuch: magnetische Nanopartikel		
Inkubationszeit Antikörper/Nanopartikel in min	30/30	60/60	90/90	30/30	60/60	90/90	-/30	-/60	-/90
Inkubationstemperatur Antikörper/Nanopartikel in °C	37/37	37/37	37/37	37/37	37/37	37/37	-/37	-/37	-/37
Ausgangszellzahl	10x10 ⁶ Zellen			8x10 ⁶ Zellen			10x10 ⁶ Zellen		
Negativ Fraktion in % von Ausgangszellzahl	6,25	5	3,2	5,5	3	0	40	20	35
Positiv Fraktion in % (Zellzahl x 10 ⁶)	93,75 (9,4	95 9,5	96,8 9,7	94,5 7,6	97 7,8	100 8,0	60 6,0	80 8,0	65 6,5)

Die Analyse dieser magnetisch markierten Zellen auf Eisenoxid zeigte eine Abnahme der Eisenoxidgehalt in den Zellen mit längerer CD106-Antikörper- bzw. Ferrofluidinkubation. So konnte nach der Behandlung über 30 min mit den Antikörpern und den Nanopartikeln eine Eisenoxidgehalt von 0,177 pg pro Zelle im ersten Versuch und 0,245 pg pro Zelle im zweiten Versuch ermittelt werden (Versuchsansätze 1, VA 1). Nach 90 min Inkubation mit beiden Komponenten lag der Eisenoxidgehalt nur noch bei 0,048 pg bzw. 0,047 pg pro Zelle in den Versuchen (Versuchsansätze 3, VA 3) (Abbildung 9). Bei der Untersuchung der Kontrollansätze (KA 1-3), die nur mit Nanopartikeln behandelt wurden, zeigten sich hohe Eisenoxidgehalt in den Zellen. Diese lagen zwischen 0,115 und 0,335 pg pro Zelle. Die, zur Bestimmung des nativen Eisenoxidgehaltes, untersuchten unbehandelten SVEC4-10 Zellen erbrachten im Mittelwert eine Eisenoxidgehalt von $0,042 \pm 0,030$ pg pro Zelle.

Die Analysen, zur Untersuchung des Gehalts an ungebundenen Ferrofluid in den letzten Spüllösungen der magnetisch markierten SVEC4-10 Zellansätze, ergaben nur sehr geringe Konzentrationen an Eisenoxid, die zwischen 0,5 und 2,5 % des

5. Ergebnisse

Eisenoxidgehalts des zugehörigen Zellansatzes lagen. Daher kann angenommen werden, dass ungebundene Nanopartikel weitgehend aus den Zellansätzen entfernt werden konnten.

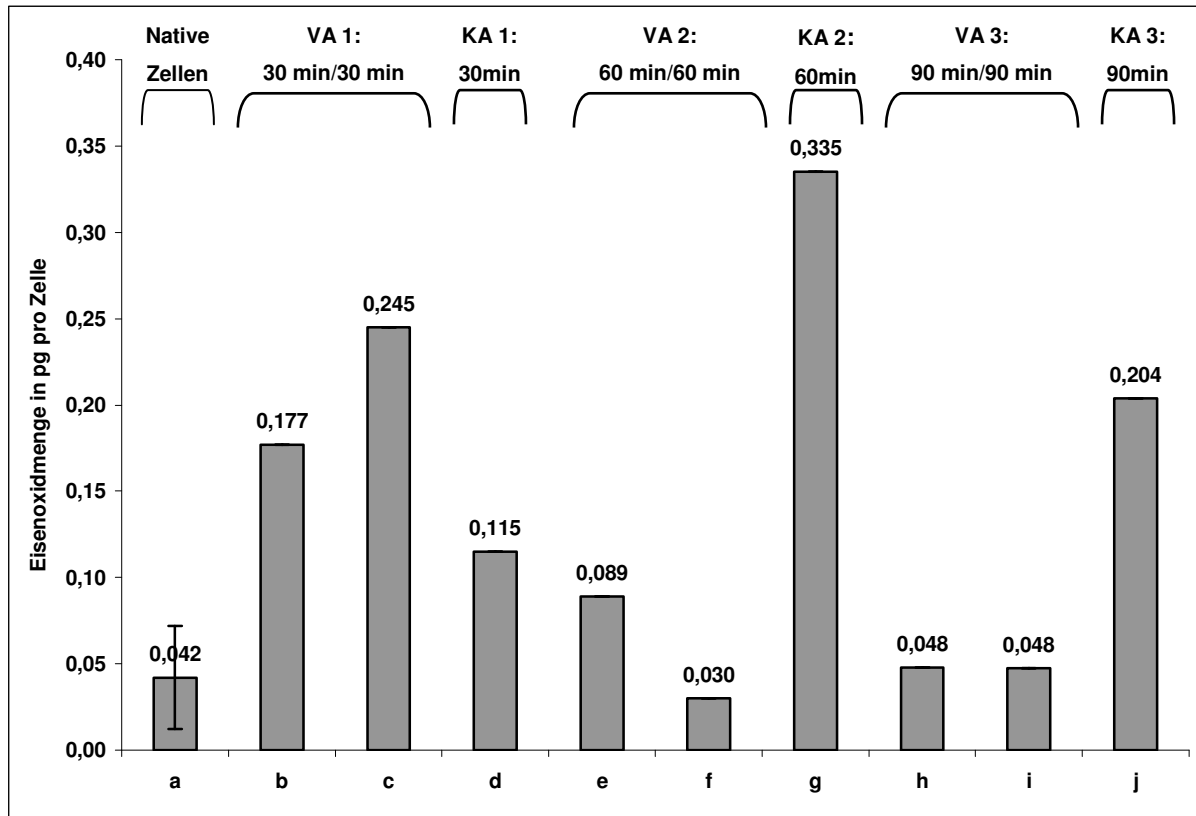


Abbildung 9: Eisenoxidgehalten nach Inkubation von SVEC4-10 Zellen mit biotinylierten CD106-Antikörpern und Streptavidin gekoppelten magnetischen Nanopartikeln unter Verwendung der Mehrschrittmethod (VA, Versuchsansätze). Zur Untersuchung der Bindungsspezifität wurde die alleinige Bindung der magnetischen Nanopartikel, ohne Antikörperbehandlung, an SVEC4-10 Zellen analysiert (KA, Kontrollansätze). Ebenso wurden native Zellen auf ihren Eisenoxidgehalt untersucht. Versuchsansätze (VA), die zu gleichen Inkubationszeiten behandelt wurden, sind durch Klammern gekennzeichnet. Auf diesen sind die Behandlungszeiten mit den Antikörpern und Nanopartikeln aufgetragen. Ebenso sind die Kontrollansätze (KA) mit Klammern, auf denen die Behandlungszeit aufgetragen ist, gekennzeichnet. a) Eisenoxidgehalt nativer SVEC4-10 Zellen, Mittelwert und Standardabweichung aus 3 Ansätzen; b und c) VA 1: Eisenoxidgehalten in SVEC4-10 Zellen nach Inkubation mit Antikörpern und Nanopartikeln für jeweils 30 min bei 37 °C; d) KA 1: Eisenoxidgehalt in SVEC4-10 Zellen nach Inkubation mit Nanopartikeln für 30 min bei 37 °C; e und f) VA 2: Eisenoxidgehalten in SVEC4-10 Zellen nach Inkubation mit Antikörpern und Nanopartikeln für jeweils 60 min bei 37 °C; g) Eisenoxidgehalt in SVEC4-10 Zellen nach Inkubation mit Nanopartikeln für 60 min bei 37 °C; h und i) Eisenoxidgehalten in SVEC4-10 Zellen nach Inkubation mit Antikörpern und Nanopartikeln für jeweils 90 min bei 37 °C; j) Eisenoxidgehalt in SVEC4-10 Zellen nach Inkubation mit magnetischen Nanopartikeln für 90 min bei 37 °C.

5. Ergebnisse

5.3.2.2. Zellmarkierung in Abhängigkeit von der Dauer der Ferrofluidinkubation

Nach der Behandlung von SVEC4-10 Zellen mit CD106-Antikörper für 30 min und streptavidinhaltigen magnetischen Nanopartikeln für 30, 60 und 90 min jeweils bei 37°C lag der Anteil an magnetisch markierten Zellen (positiv Fraktion) zwischen 94 und 100 % in zwei unabhängigen Versuchen (Tabelle 6). In einer Untersuchung zur Bindungsspezifität mit einem Isotyp-Antikörper unter gleichen Bedingungen wurden dagegen nur zwischen 41 und 53 % der Zellen magnetisch markiert (Tabelle 6).

Tabelle 6: Dargestellt sind die Ausgangszellzahlen, sowie die Zahlen der magnetisch markierten (positiv Fraktion) und unmarkierten (negativ Fraktion) SVEC4-10 Zellen nach Inkubation der Zellen unter Anwendung der Mehrschrittmethode mit CD106- bzw. Isotyp-Antikörpern für 30min bei 37°C und mit magnetischen Nanopartikeln für 30/60/90 min bei 37°C.

	1.Versuch: CD106-Antikörper und Nanopartikel			2.Versuch: CD106-Antikörper und Nanopartikel			3.Versuch: Isotyp-Antikörper und Nanopartikel		
Inkubationszeit Antikörper/Nanopartikel in min	30/30	30/60	30/90	30/30	30/60	30/90	30/30	30/60	30/90
Inkubationstemperatur Antikörper/Nanopartikel in °C	37/37	37/37	37/37	37/37	37/37	37/37	37/37	37/37	37/37
Ausgangszellzahl	8x10 ⁶ Zellen			8x10 ⁶ Zellen			10x10 ⁶ Zellen		
Negativ Fraktion in % von Ausgangszellzahl	2,8	5,6	5,6	5,6	0	0	58,6	58,6	47
Positiv Fraktion in % (Zellzahl x10 ⁶)	97,8 (7,8	94,4 7,55	94,4 7,55	94,4 7,55	100 8,0	100 8,0	41,4 4,14	41,4 4,14	53 5,3)

Die magnetisch markierten Zellen der positiv Fraktionen wurden auf ihren Eisenoxidgehalt untersucht, und es konnte eine Abnahme der Eisenoxidmenge in den Zellen mit längerer Dauer der Ferrofluidinkubation, wie bereits unter 5.3.2.1 festgestellt, ermittelt werden. Es zeigte sich nach der 30 minütiger Behandlung der Zellen mit den Antikörpern und den Nanopartikeln bei 37°C ein Eisenoxidgehalt von 0,724 pg pro Zelle, dieser nahm nach 60 und 90 minütiger Ferrofluidbehandlung auf 0,534 pg pro Zelle ab (Versuchsansätze, VA 1-3) (Abbildung 10). Im Wiederholungsversuch konnte diese Tendenz bestätigt werden, hierbei nahm der

5. Ergebnisse

Eisenoxidgehalt der Zellen von 0,641 pg pro Zellen (30 min MNP) auf 0,345 pg pro Zelle (90 min MNP) ab. Nach der Behandlung der SVEC4-10 Zellen mit dem Isotyp-Antikörper unter gleichen Versuchsbedingungen zeigten sich geringere Eisenoxids Mengen in den Zellen als nach der CD106-Antikörper Behandlung. Diese lagen nach 30 min Isotyp-Antikörper und 30, 60 und 90 min Ferrofluidbehandlung bei 0,028 pg, 0,087 pg und 0,067 pg pro Zelle (Kontrollansätze, KA 1-3) (Abbildung 10). Die Untersuchungen an unbehandelten SVEC4-10 Zellen zur Bestimmung des nativen Eisenoxidgehaltes zeigten im Mittelwert aus 3 Ansätzen einen Eisenoxidgehalt von $0,03 \pm 0,008$ pg pro Zelle. Die Analysen der Spüllösungen aller mit Ferrofluid behandelten Zellen ergaben geringe Eisenoxidgehalte von unter 8 % bezogen auf den Gehalt des zugehörigen Ansatzes, und lassen daher eine nahezu vollständig Entfernung des ungebundenen Ferrofluids annehmen.

5. Ergebnisse

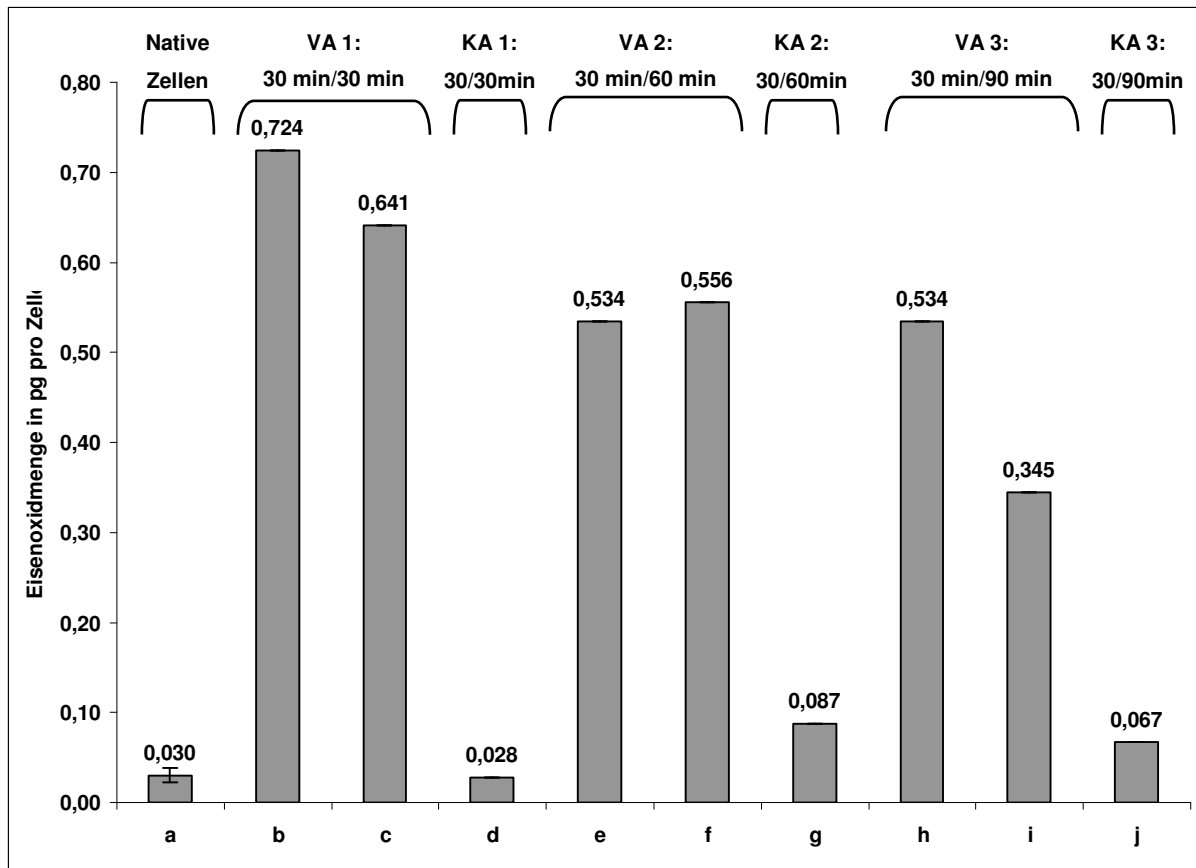


Abbildung 10: Eisenoxidgehalten nach Inkubation von SVEC4-10 Zellen mit biotinylierten CD106-Antikörpern und Streptavidin gekoppelten magnetischen Nanopartikeln unter Verwendung der Mehrschrittmethod (VA, Versuchsansätze). Zur Untersuchung der Bindungsspezifität wurde eine Behandlung der Zellen mit einem Isotyp-Antikörper und den Nanopartikeln durchgeführt (KA, Kontrollansätze). Ebenso wurden native Zellen auf ihren Eisenoxidgehalt untersucht. Versuchsansätze (VA), die zu gleichen Inkubationszeiten behandelt wurden, sind durch Klammern gekennzeichnet. Auf diesen sind die Behandlungszeiten mit den Antikörpern und Nanopartikeln aufgetragen. Ebenso sind die Kontrollansätze (KA) mit Klammern, auf denen die Behandlungszeit aufgetragen ist, gekennzeichnet. a) Eisenoxidgehalt nativer SVEC4-10 Zellen, Mittelwert und Standardabweichung aus 3 Ansätzen; b und c) VA 1: Eisenoxidgehalten in SVEC4-10 Zellen nach Inkubation mit Antikörpern und Nanopartikeln für jeweils 30 min bei 37°C; d) KA 1: Eisenoxidgehalt in SVEC4-10 Zellen nach Inkubation mit Isotyp-Antikörpern für 30 min und Nanopartikeln für 30 min bei 37°C; e und f) VA 2: Eisenoxidgehalten in SVEC4-10 Zellen nach Inkubation mit Antikörpern für 30 min und Nanopartikeln für 60 min bei 37°C; g) Eisenoxidgehalt in SVEC4-10 Zellen nach Inkubation mit Isotyp-Antikörper für 30 min und Nanopartikeln für 60 min bei 37°C; h und i) Eisenoxidgehalten in SVEC4-10 Zellen nach Inkubation mit Antikörpern für 30 min und Nanopartikeln für 90 min bei 37°C; j) Eisenoxidgehalt in SVEC4-10 Zellen nach Inkubation mit Isotyp-Antikörpern für 30 min und magnetischen Nanopartikeln für 90 min bei 37°C.

Zur Untersuchung des Einflusses der Ferrofluid-Inkubationsdauer wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt. Hierbei wurde die Temperatur der Antikörper-Behandlung von 37°C auf 4°C reduziert, die Dauer der Antikörperbehandlung und die Bedingungen der Ferrofluidbehandlung blieben konstant. So wurden SVEC4-10

5. Ergebnisse

Zellen für 30 min mit CD106-Antikörpern bei 4°C inkubiert und anschließend mit Streptavidin gekoppelten magnetischen Nanopartikeln für 30, 60 und 90 min bei 37°C behandelt. Der Anteil der hierdurch magnetisch markierten Zellen lag in zwei Versuchen zwischen 94 und 100 % (Tabelle 7). Im Gegensatz dazu konnten bei der Behandlung von SVEC4-10 Zellen mit dem Isotyp-Antikörper und dem Ferrofluid unter gleichen Bedingungen nur zwischen 37,5 und 80 % magnetisch markierte Zellen gefunden werden (Tabelle 7).

Tabelle 7: Dargestellt sind die Ausgangszellzahlen, sowie die Zahlen der magnetisch markierten (positiv Fraktion) und unmarkierten (negativ Fraktion) SVEC4-10 Zellen nach Inkubation der Zellen unter Anwendung der Mehrschrittmethode mit CD106- bzw. Isotyp-Antikörpern für 30 min bei 4°C und mit magnetischen Nanopartikeln für 30 /60 /90 min bei 37°C.

	1.Versuch: CD106-Antikörper und Nanopartikel			2.Versuch: CD106-Antikörper und Nanopartikel			3.Versuch: Isotyp-Antikörper und Nanopartikel		
Inkubationszeit Antikörper/Nanopartikel in min	30/30	30/60	30/90	30/30	30/60	30/90	30/30	30/60	30/90
Inkubationstemperatur Antikörper/Nanopartikel in °C	4/37	4/37	4/37	4/37	4/37	4/37	4/37	4/37	4/37
Ausgangszellzahl	8 x 10 ⁶ Zellen			10 x 10 ⁶ Zellen			10 x 10 ⁶ Zellen		
Negativ Fraktion in % von Ausgangszellzahl	5,6	0	2,5	5,8	2	2	80	37,5	47
Positiv Fraktion in % (Zellzahl x10 ⁶)	94,4 (7,55)	100 8,0	97,5 7,8	94,2 9,4	98 9,8	98 9,8	20 2	62,5 6,25	53 5,3)

Die Eisenoxidbestimmung der markierten Zellen zeigte hierbei deutlich, dass größere Mengen an Eisenoxid in den Zellen nach Behandlung mit CD106-Antikörpern als nach Inkubation mit Isotyp-Antikörpern vorhanden waren. Ein Zusammenhang zwischen Abnahme der Eisenoxidmenge in den Zellen mit Dauer der Ferrofluidinkubation konnte in den Versuchen nicht eindeutig gefunden werden. Die Eisenoxidkonzentration nach der 30 min Behandlung mit Antikörper und Ferrofluid war mit 0,870 pg pro Zelle im ersten Versuch hoch, sonst lag sie im Bereich von 0,172 pg bis 0,324 pg pro Zelle in den Experimenten (Versuchsansätze, VA 1-3) (Abbildung 11). Die Eisenoxidgehalte nach Isotyp-Antikörper Behandlung lagen

5. Ergebnisse

zwischen 0,037 pg und 0,054 pg pro Zelle (Kontrollansätze, KA 1-3). Die nativen unbehandelten SVEC4-10 Zellen wiesen im Mittel eine Eisenoxidkonzentration von $0,015 \pm 0,00046$ pg pro Zelle auf. Die Eisenoxidmenge in den Spüllösungen der Proben, zur Bestimmung des ungebundenen Ferrofluids, schwankte zwischen 1 und 10% bezogen auf den Gehalt an Eisenoxid der zugehörigen Probe. Eine weitgehende Entfernung kann also angenommen werden.

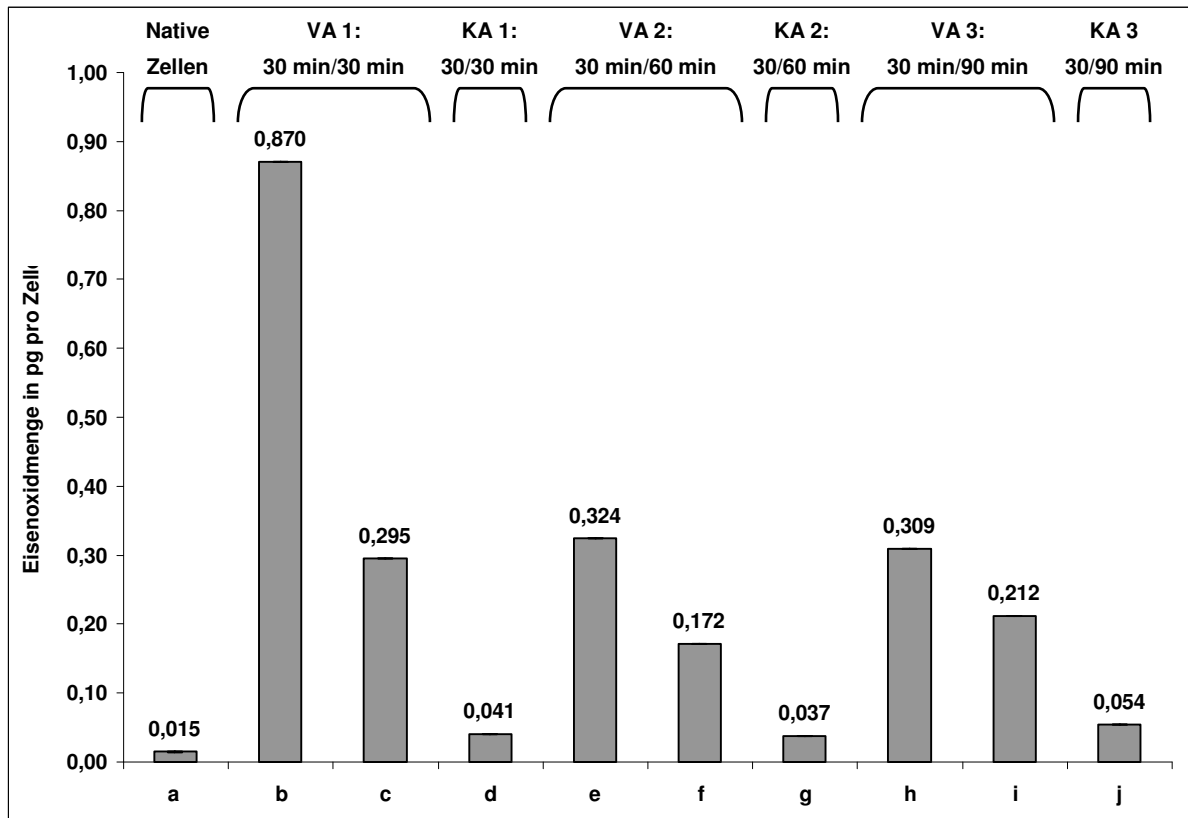


Abbildung 11: Eisenoxidgehalten nach Inkubation von SVEC4-10 Zellen mit biotinylierten CD106-Antikörpern und Streptavidin gekoppelten magnetischen Nanopartikeln unter Verwendung der Mehrschrittmethod (VA, Versuchsansätze). Zur Untersuchung der Bindungsspezifität wurde eine Behandlung der Zellen mit einem Isotyp-Antikörper und den Nanopartikeln durchgeführt (KA, Kontrollansätze). Ebenso wurden native Zellen auf ihren Eisenoxidgehalt untersucht. Versuchsansätze (VA), die zu gleichen Inkubationszeiten behandelt wurden, sind durch Klammern gekennzeichnet. Auf diesen sind die Behandlungszeiten mit den Antikörpern und Nanopartikeln aufgetragen. Ebenso sind die Kontrollansätze (KA) mit Klammern, auf denen die Behandlungszeit aufgetragen ist, gekennzeichnet. a) Eisenoxidgehalt nativer SVEC4-10 Zellen, Mittelwert und Standardabweichung aus 3 Ansätzen; b und c) VA 1: Eisenoxidgehalten in SVEC4-10 Zellen nach Inkubation mit Antikörpern für 30 min bei 4°C und Nanopartikeln für 30 min bei 37°C; d) KA 1: Eisenoxidgehalt in SVEC4-10 Zellen nach Inkubation mit Isotyp-Antikörpern für 30 min bei 4°C und Nanopartikeln für 30 min bei 37°C; e und f) VA 2: Eisenoxidgehalten in SVEC4-10 Zellen nach Inkubation mit Antikörpern für 30 min bei 4°C und Nanopartikeln für 60 min bei 37°C; g) Eisenoxidgehalt in SVEC4-10 Zellen nach Inkubation mit Isotyp-Antikörper für 30 min bei 4°C und Nanopartikeln für 60 min bei 37°C; h und i) Eisenoxidgehalten in SVEC4-10 Zellen nach Inkubation mit Antikörpern für 30 min bei 4°C und Nanopartikeln für 90 min bei 37°C; j) Eisenoxidgehalt in SVEC4-10 Zellen nach Inkubation mit Isotyp-Antikörpern für 30 min bei 4°C und magnetischen Nanopartikeln für 90 min bei 37°C.

5. Ergebnisse

5.3.3. Magnetische Markierung von Zellen mit der Einschrittmethode

5.3.3.1. Markierung von SVEC4-10 Zellen mit der Brückenmolekül-Sonde

Im Rahmen der Untersuchungen mit den Brückenmolekül-Sonden wurden die SVEC4-10 Zellen für 30, 60 und 90 min bei 37 °C mit diesen Sonden inkubiert. Der Anteil der magnetisch markierten Zellen nach dieser Behandlung mit der CD106-Brückenmolekül-Sonde lag zwischen 93 und 100 % (Tabelle 8). Hingegen fand sich nach Inkubation der Zellen mit der Isotyp-Brückenmolekül-Sonde, die der Untersuchung der Bindungsspezifität diente, ein Anteil magnetisch markierter Zellen von 70 bis 95 % (Tabelle 8).

Tabelle 8: Dargestellt sind die Ausgangszellzahlen, sowie die Zahlen der magnetisch markierten (positiv Fraktion) und unmarkierten (negativ Fraktion) SVEC4-10 Zellen nach Inkubation der Zellen unter Anwendung der Einschrittmethode mit den CD106- bzw. Isotyp-Brückenmolekül-Sonden für 30, 60 und 90 min bei 37 °C.

	1. Versuch: CD106- Brückenmolekül- Sonde			2. Versuch: CD106- Brückenmolekül- Sonde			3. Versuch: Isotyp- Brückenmolekül- Sonde		
Inkubationszeit Sonde in min	30	60	90	30	60	90	30	60	90
Inkubationstemperatur Sonde in °C	37	37	37	37	37	37	37	37	37
Ausgangszellzahl	8 x 10 ⁶ Zellen			8 x 10 ⁶ Zellen			8 x 10 ⁶ Zellen		
Negativ Fraktion in % von Ausgangszellzahl	7	0	0	5,8	7	0	30	30	5
Positiv Fraktion in % (Zellzahl x10 ⁶)	93 (7,44	100 8,0	100 8,0	94,2 7,54	93 7,44	100 8,0	70 5,6	70 5,6	95 7,6)

Die, nach der Markierung der Zellen mit der CD106-Brückenmolekül-Sonde, durchgeführte Bestimmung der Eisenoxidkonzentration der Zellen ergab Werte zwischen 0,761 pg und 0,406 pg pro Zelle (Versuchsansätze 1-3). Auffällig ist die Abnahme der Eisenoxidmenge in den Zellen mit längerer Behandlungsdauer (Abbildung 12). Diese Tendenz konnte im zweiten Experiment bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der mit Isotyp-Brückenmolekül-Sonden behandelten Zellen erbrachte Eisenoxidgehalte von 0,075 pg bis 0,094 pg pro Zelle

5. Ergebnisse

(Kontrollansätze 1-3) Die nativen SVEC4-10 Zellen hatten im Mittel einen Eisenoxidgehalt von 0,029 pg pro Zelle. In den Spüllösungen der Proben, zur Bestimmung der ungebundenen Sondenanteile, zeigten sich Eisenoxidkonzentrationen von maximal 7 % des Eisenoxidgehaltes der zugehörigen Probe, was auf eine weitgehende Entfernung von ungebundenen Sondenresten durch die Waschvorgänge schließen lässt.

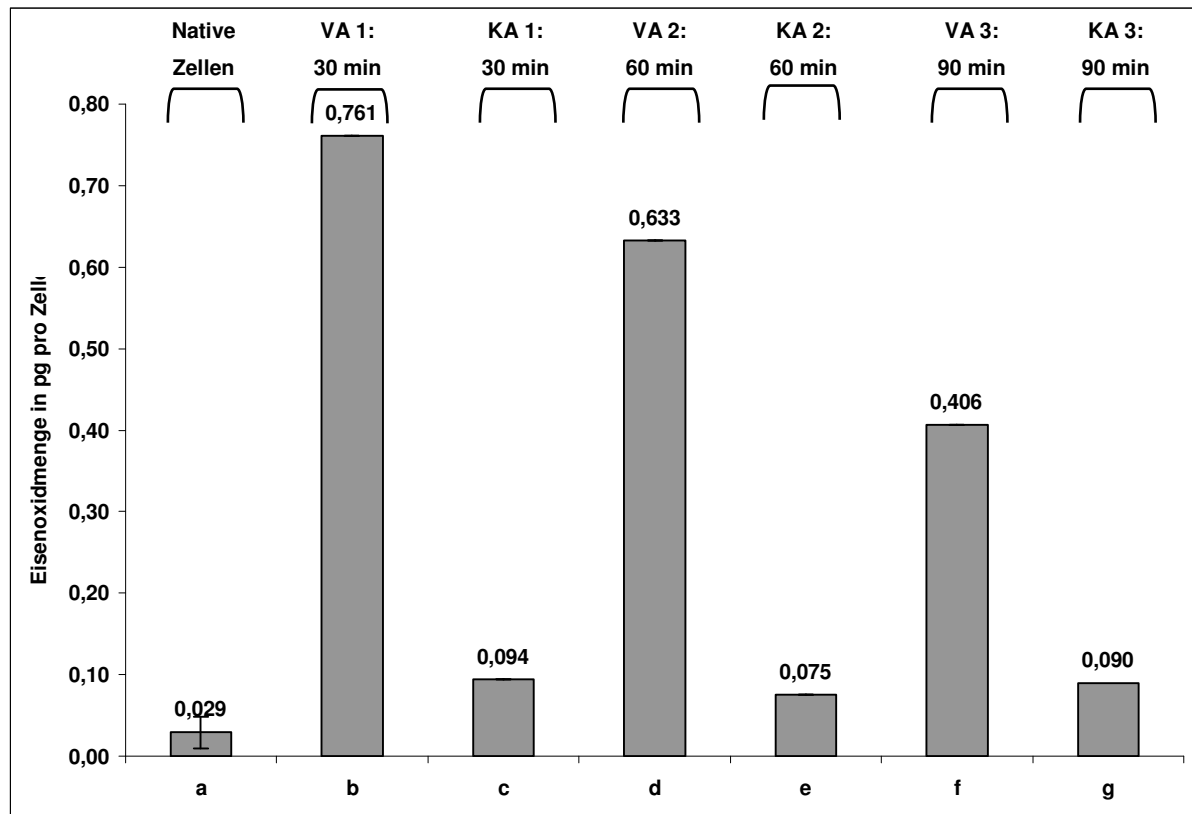


Abbildung 12: Eisenoxids Mengen nach Inkubation von SVEC4-10 Zellen mit der CD106-Brückenmolekül-Sonde unter Verwendung der Einschrittmethode (VA, Versuchsansätze). Zur Untersuchung der Bindungsspezifität wurde eine Behandlung der Zellen mit einer Isotyp-Brückenmolekül-Sonde durchgeführt (KA, Kontrollansätze). Ebenso wurden native Zellen auf ihren Eisenoxidgehalt untersucht. Die VA und KA sind durch Klammern gekennzeichnet, auf denen die Behandlungszeiten mit den Sonden aufgetragen sind. a) Eisenoxidgehalt nativer SVEC4-10 Zellen, Mittelwert und Standardabweichung aus 3 Ansätzen; b) VA 1: Eisenoxidsmenge in SVEC4-10 Zellen nach Inkubation mit der CD106-Brückenmolekül-Sonde für 30 min bei 37°C; c) KA 1: Eisenoxidsmenge in SVEC4-10 Zellen nach Inkubation mit der Isotyp-Brückenmolekül-Sonde für 30 min bei 37°C; d) VA 2: Eisenoxidsmenge in SVEC4-10 Zellen nach Inkubation mit der CD106-Brückenmolekül-Sonde für 60 min bei 37°C; e) KA 2: Eisenoxidsmenge in SVEC4-10 Zellen nach Behandlung mit der Isotyp-Brückenmolekül-Sonde für 60 min bei 37°C; f) VA 3: Eisenoxidsmenge in SVEC4-10 Zellen nach Inkubation mit der CD106-Brückenmolekül-Sonde für 90 min bei 37°C; g) KA 3: Eisenoxidsmenge in SVEC4-10 Zellen nach Behandlung mit der Isotyp-Brückenmolekül-Sonde für 90 min bei 37°C.

5.3.3.2. Markierung von Zellen mit funktionalisierten Sonden

5.3.3.2.a. Magnetische Markierung der SVEC4-10 Zellen unter Einsatz der funktionalisierten CD106-Sonden

Charakteristisch für die funktionalisierten CD106-Sonde ist ihr Proteingehalt von 250 µg/ml Sonde und ihr Eisenoxidgehalt von 21,6 mg/ml. Zur Analyse der Spezifität der Bindung wurde eine funktionalisierte Isotyp-Sonde verwendet und auf ihren Protein- und Eisenoxidgehalt untersucht. Dabei ergaben sich 162,5 µg Protein und 21,4 mg Eisenoxid pro ml Sonde. Die beiden Sonden wurden unter gleichen Versuchsbedingungen eingesetzt.

Nach Zugabe von 100 µl der funktionalisierten CD106-Sonde war die Eisenoxidkonzentration in 3×10^7 SVEC4-10 Zellen doppelt so hoch (0,214 pg pro Zelle) als nach Behandlung mit der funktionalisierten Isotyp-Sonde (0,110 pg pro Zellen). Im Vergleich zu nativen Zellen (0,024 pg pro Zelle) verneunfachte sich der Eisenoxidgehalt der Zellen sogar (Abbildung 13 I). Die durch Waschen abgetrennten ungebundenen Sondenanteile (Agglomerate) wiesen einen Eisenoxidgehalt von 10,6 µg (CD106-Sonde) bzw. 17,6 µg (Isotyp-Sonde) auf. In den Spüllösungen der Proben konnten ebenfalls noch Eisenoxidrückstände gefunden werden, sie lagen zwischen 30 und 100 % des zugehörigen Probengehaltes.

Die Behandlung von 5×10^7 SVEC4-10 Zellen mit 120 µl der CD106- bzw. Isotyp-Sonden ergab vergleichbare Eisenoxidgehalte in den Zellen (0,306 pg bzw. 0,359 pg pro Zelle) (Abbildung 13 II). Wiederrum zeigt sich eine enorme Steigerung der Eisenoxidmenge in den behandelten Zellen im Vergleich zu den nativen Zellen (0,014 pg pro Zellen). Die Untersuchung der isolierten Agglomerate ergab eine Eisenoxidkonzentration von 25,6 µg (CD106-Sonde) bzw. 20,9 µg (Isotyp-Sonde). Die Eisenoxidrückstände in den Spüllösungen beliefen sich auf 18 bis 30 % des Eisenoxidgehaltes des zugehörigen Zellansatzes.

5. Ergebnisse

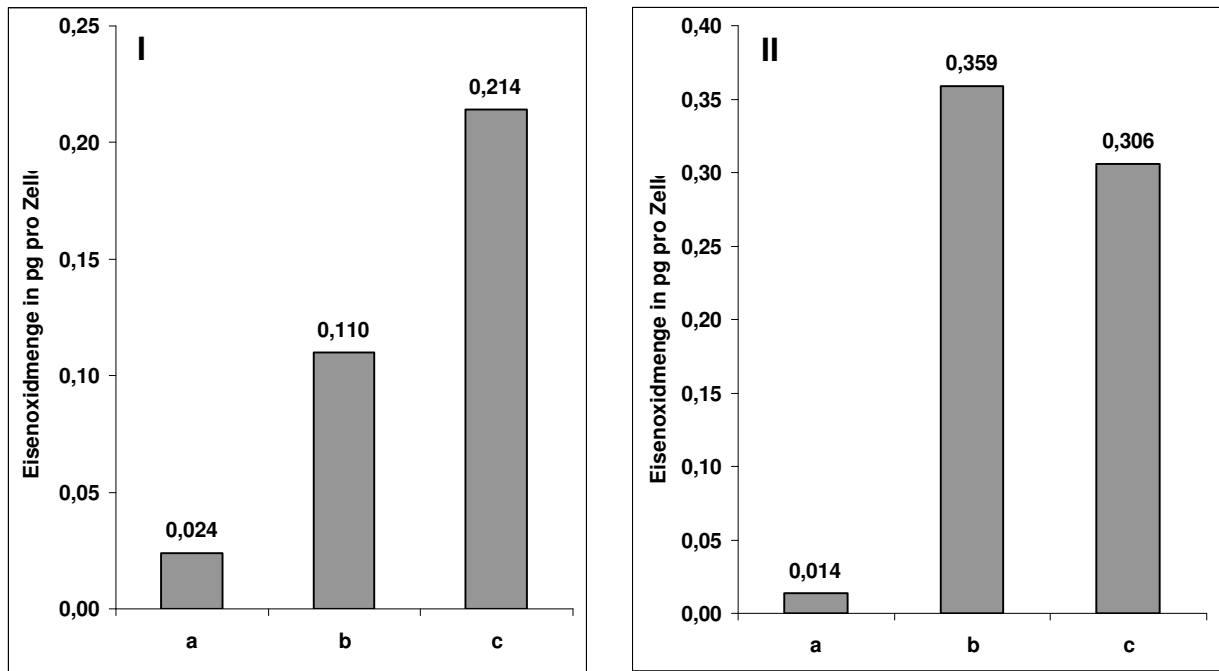


Abbildung 13: Eisenoxidgehalte pro Zelle nach Inkubation von SVEC4-10 Zellen mit funktionalisierten CD106-Sonden unter Verwendung der Einschrittmethode. Zur Untersuchung der Bindungsspezifität wurde eine Behandlung der Zellen mit einer funktionalisierten Isotyp-Sonde durchgeführt. Ebenso wurden native Zellen auf ihren Eisenoxidgehalt untersucht. I) Eisenoxidgehalt nach Behandlung von 3x10⁷ SVEC4-10 Zellen mit den Sonden für 30 min bei 37°C; a) native Zellen; b) Behandlung der Zellen mit funktionalisierten Isotyp-Sonden; c) Behandlung der Zellen mit funktionalisierten CD106-Sonden. II) Eisenoxidgehalt nach Behandlung von 5x10⁷ SVEC4-10 Zellen mit den Sonden für 30 min bei 37°C; a) native Zellen; b) Behandlung der Zellen mit funktionalisierten Isotyp-Sonden; c) Behandlung der Zellen mit funktionalisierten CD106-Sonden.

Die elektronenmikroskopische Aufnahme der SVEC4-10 Zellen nach der Behandlung mit der funktionalisierten CD106-Sonde zeigt eine Anreicherung des magnetischen Materials an der Zelloberfläche (Abbildung 14b). Dieser Zusammenhang wird an unbehandelten Zellen (Abbildung 14a) nicht gefunden. Ebenso sind intrazellulär, neben den Zellorganellen, Einschlüsse von internalisierten magnetischen Nanopartikeln sichtbar (Abbildung 14b, Pfeile).

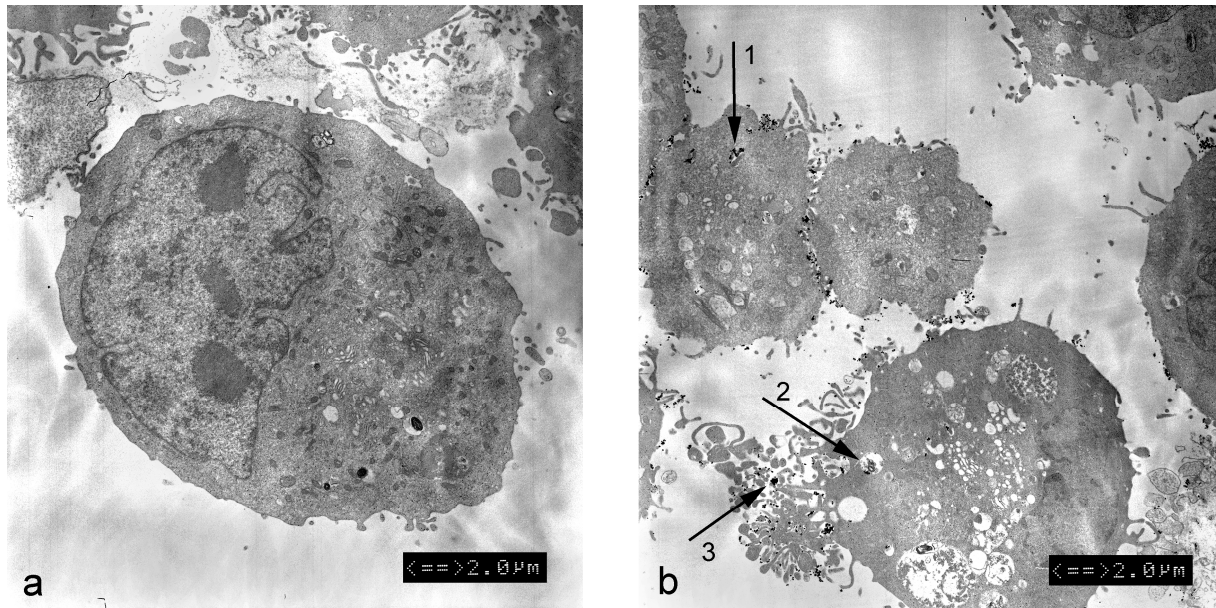


Abbildung 14: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von SVEC4-10 Zellen. a) native SVEC4-10 Zellen ohne magnetisches Material; b) SVEC4-10 Zellen nach Behandlung mit der funktionalisierten CD106-Sonde. Die Pfeile 1 und 2 zeigen von der Zelle bereits internalisierte Nanopartikel, Pfeil 3 zeigt Partikel während des Aufnahmeprozesses in die Zelle. Messbalken 2 µm.

5.3.3.2.b. Magnetische Markierung der SK-BR-3 Zellen unter Einsatz der funktionalisierten Her-2-Sonden

Die Charakteristika der funktionalisierten Her-2-Sonde waren ein Proteingehalt von 385 µg/ml und ein Eisenoxidgehalt von 45,6 mg/ml. Die als Kontrollen zur Spezifität der Bindung hergestellten funktionalisierten Isotyp-Sonden wiesen einen Proteingehalt von 162,5 µg/ml und eine Eisenoxiddkonzentration von 21,4 mg/ml auf. Nach Behandlung von $6,25 \times 10^7$ SK-BR-3 Zellen mit 100 µl der Sonden konnte ein dreimal höherer Gehalt an Eisenoxid in den mit der Her-2-Sonde behandelten Zellen (1,242 pg pro Zelle) als in den mit der Isotyp-Sonde inkubierten Zellen (0,412 pg pro Zelle) gefunden werden (Abbildung 16). In den nativen Zellen lag der Eisenoxidgehalt bei 0,057 pg pro Zelle vor. Im Wiederholungsexperiment konnten die Daten bestätigt werden. In Abbildung 15 sind die drei Versuchsansätze dargestellt, es lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Färbung und dem Eisenoxidgehalt der Ansätze erkennen. Die Analyse der aus den Proben entfernten Agglomerate erbrachte eine Eisenoxidgehaltmenge von 429 µg (Her-2-Sonde) bzw. 13,5 µg (Isotyp-Sonde). Die Untersuchung der letzten Spüllösung der Proben ergab einen Gehalt an Eisenoxid von 22% bzw. 6% des Eisenoxidgehaltes der zugehörigen Probe.

5. Ergebnisse

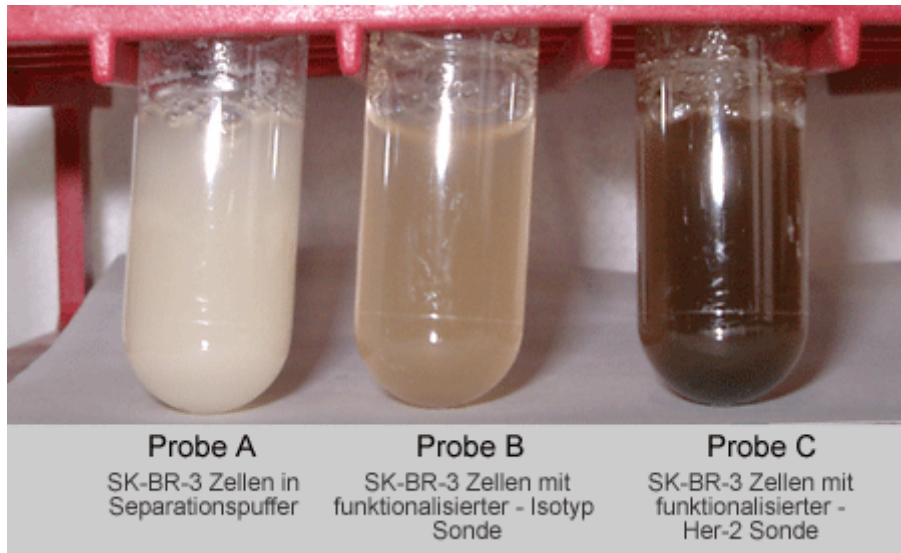


Abbildung 15: Native bzw. mit den funktionalisierten Her-2- und funktionalisierten Isotyp-Sonden für 30 min bei 37 °C behandelte SK-BR-3 Zellen. Probe A: $6,25 \times 10^7$ native SK-BR-3 Zellen in Separationspuffer; Probe B: SK-BR-3 Zellen nach Behandlung mit der funktionalisierten Isotyp-Sonde; Probe C: SK-BR-3 Zellen nach Inkubation mit der funktionalisierten Her-2-Sonde.

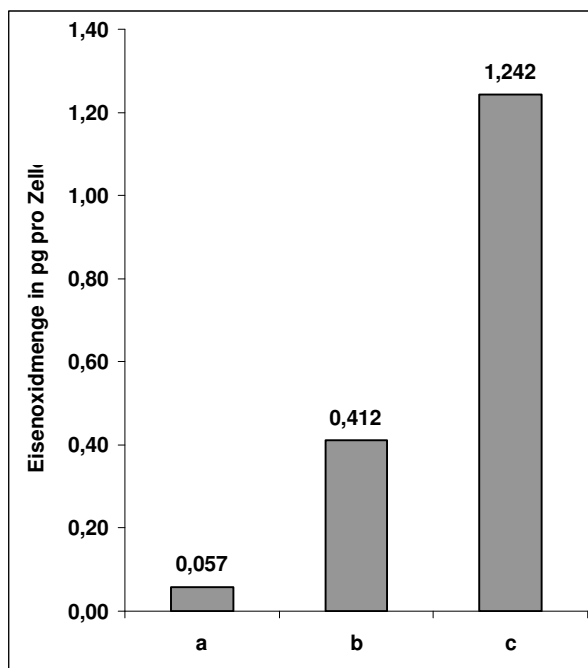


Abbildung 16: Eisenoxidgehalte pro Zelle nach Inkubation von $6,25 \times 10^7$ SK-BR-3 Zellen mit funktionalisierten Her-2-Sonden unter Verwendung der Einschritt-Methode. Zur Untersuchung der Bindungsspezifität wurde eine Behandlung der Zellen mit funktionalisierten Isotyp-Sonden durchgeführt. Ebenso wurden native Zellen auf ihren Eisenoxidgehalt untersucht. a) native Zellen; b) Behandlung der Zellen mit funktionalisierten Isotyp-Sonden; c) Behandlung der Zellen mit funktionalisierten Her-2-Sonden.

5.4. Messungen im Magnetwechselfeld

5.4.1. Temperaturentwicklung nach unspezifischer Aufnahme von magnetischen Nanopartikeln

In der Temperaturkurve der mit Ferrofluid behandelten Makrophagen lässt sich ein Zusammenhang zwischen Temperaturanstieg und Inkubationszeit erkennen. So erreichten native Zellen eine Temperaturdifferenz von $1,23 \text{ K} \pm 0,15 \text{ K}$. Hingegen zeigte sich mit längerer Ferrofluid- Behandlung eine deutliche Zunahme der Temperaturdifferenz. So beträgt diese nach 12h Inkubation mit den magnetischen Nanopartikeln $15,31 \text{ K} \pm 3,52 \text{ K}$ (Abbildung 17).

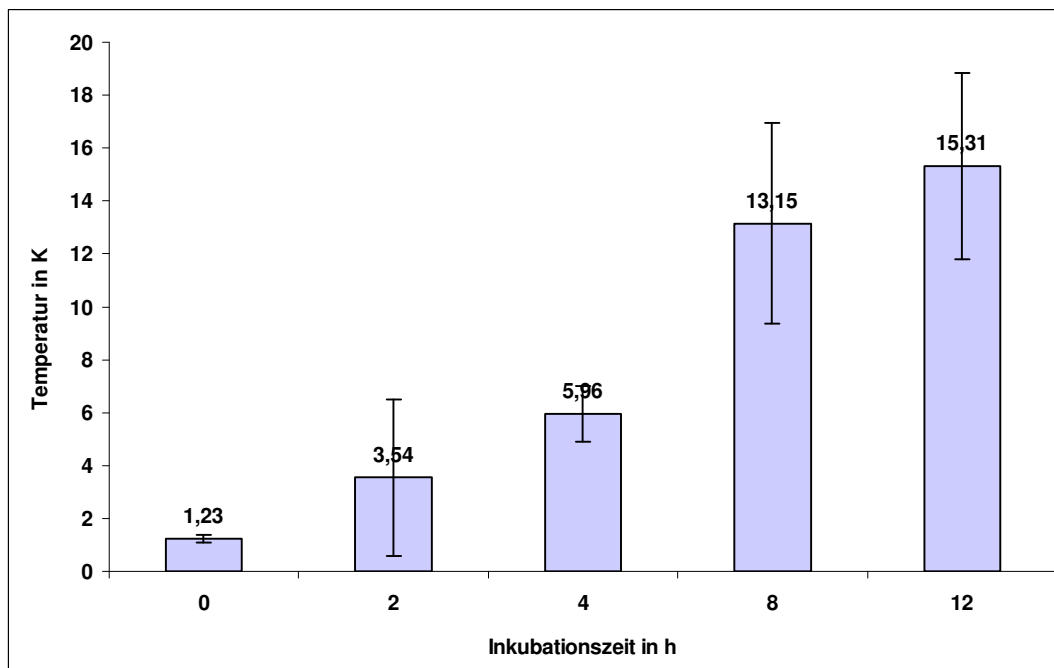


Abbildung 17: Exposition nativer und magnetisch markierter Makrophagen für 150 Sekunden im magnetischen Wechselfeld ($H = 11 \text{ kA/m}$; $f = 410 \text{ kHz}$). Dargestellt sind die Temperaturdifferenzen der unbehandelten Zellen, ebenso der mit magnetischen Nanopartikeln für 2, 4, 8 und 12h inkubierten Makrophagen. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen aus drei unabhängigen Versuchen.

5. Ergebnisse

5.4.2. Temperaturentwicklung nach spezifischer Bindung magnetischer Nanopartikel an Zellen

5.4.2.1. Temperaturentwicklung nach magnetischer Markierung von Endothelzellen mit der Mehrschrittmethode

In den Untersuchungen an SVEC4-10 Zellen unter Verwendung der Mehrschrittmethode mit den Variationen der Inkubationsbedingungen konnte kein Temperaturunterschied zwischen den behandelten und den nativen unbehandelten Zellen festgestellt werden. Die Kontrollen aus nativen Zellen wiesen, wie auch die mit den biotinylierten CD106- bzw. Isotyp-Antikörpern und den Ferrofluiden behandelten Zellen, eine Temperaturdifferenz von etwa 1 K auf. Auf eine Darstellung dieser Ergebnisse wurde daher verzichtet.

5.4.2.2. Temperaturentwicklung nach magnetischer Markierung von Zellen mit der Einschrittmethode

5.4.2.2.a. Temperaturentwicklung nach Behandlung von SVEC4-10 Zellen mit der Brückenmolekül-Sonde

Ein Temperaturanstieg konnte nach Behandlung der Zellen mit den CD106- bzw. Isotyp-Brückenmolekül-Sonden nicht ermittelt werden. Die mit den Sonden behandelten Zellen zeigten die gleiche Temperaturdifferenz von etwa 1 K wie die nativen Zellen. Auf eine Darstellung dieser Ergebnisse wurde daher verzichtet.

5.4.2.2.b. Temperaturentwicklung nach Behandlung von SVEC4-10 Zellen mit der funktionalisierten CD106-Sonde

Nach Behandlung von 3×10^7 SVEC 4-10 Zellen mit funktionalisierten CD106- und Isotyp-Sonden konnte kein Temperaturunterschied zwischen den beiden Proben gefunden werden (1,88 bzw. 1,87 K) (Abbildung 18 I). Die nativen Zellen zeigten eine Temperaturerhöhung von 0,93 K. Es zeigte sich also eine Temperaturdifferenz von etwa 1 K zwischen unbehandelten und behandelten Zellen.

5. Ergebnisse

Die Analyse von 5×10^7 SVEC4-10 Zellen im MWF zeigte ebenfalls eine Temperaturdifferenz von ca. 1 K zwischen den unbehandelten und behandelten Zellen. Zwischen den mit den funktionalisierten CD106- und Isotyp-Sonden behandelten Zellen konnte kein deutlicher Temperaturunterschied verzeichnet werden (2,49 K und 2,88 K) (Abbildung 18 II).

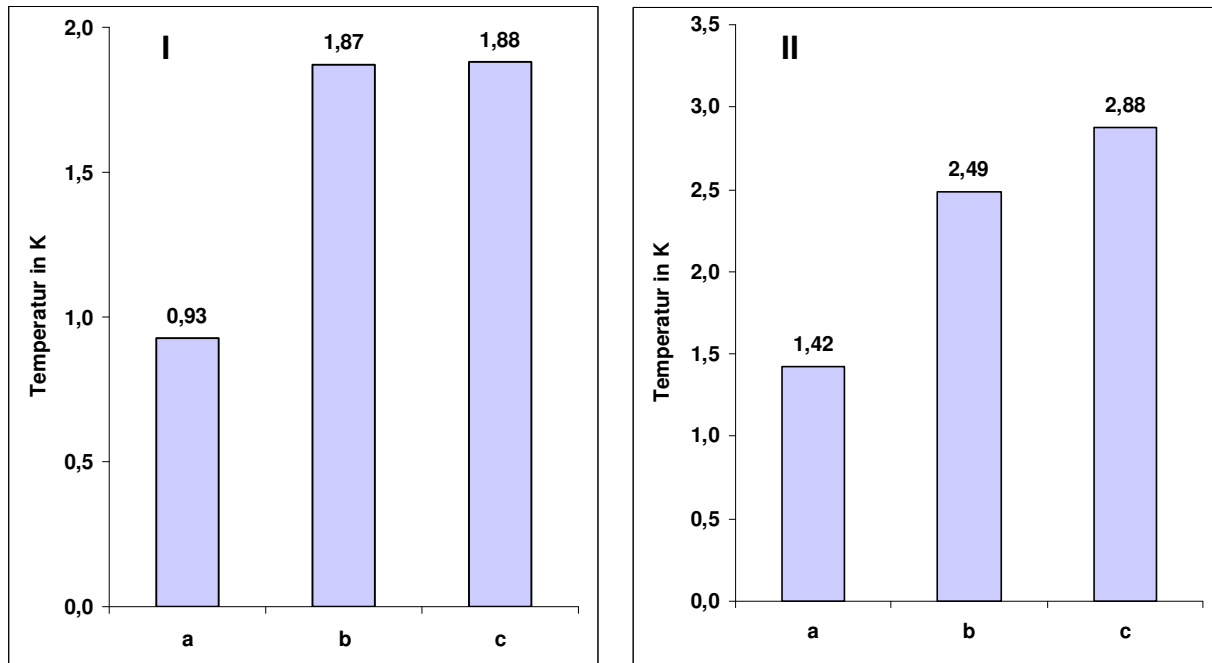


Abbildung 18: Temperaturentwicklung nach Exposition von SVEC4-10 Zellen für 150 Sekunden im magnetischen Wechselfeld (H: 11 kA/m; f: 410 kHz) nach Behandlung mit den funktionalisierten Sonden. I) Messung von 3×10^7 SVEC4-10 Zellen a) native Zellen; b) Behandlung der Zellen mit funktionalisierten Isotyp-Sonden; c) Behandlung der Zellen mit funktionalisierten CD106-Sonden. II) Messung von 5×10^7 SVEC 4-10 Zellen; a) native Zellen; b) Behandlung der Zellen mit funktionalisierten Isotyp-Sonden; c) Behandlung der Zellen mit funktionalisierten CD106-Sonden.

5.4.2.2.c. Temperaturentwicklung nach Behandlung von SK-BR-3 Zellen mit der funktionalisierten Her-2-Sonde

Ein deutlicher Temperaturanstieg von 6,02 K konnte nach Behandlung von $6,25 \times 10^7$ SK-BR-3 Zellen mit den funktionalisierten Her-2-Sonden erreicht werden. Im Vergleich hierzu lagen die Temperaturdifferenzen der nativen Zellen (0,44 K) und der mit den funktionalisierten Isotyp-Sonden behandelten Zellen (1,03 K) deutlich darunter (Abbildung 19). Es lässt sich also eine Temperaturdifferenz von 5 K zwischen den mit beiden funktionalisierten Sonden behandelten Zellen verzeichnen. Im Wiederholungsversuch konnten diese Daten bestätigt werden.

5. Ergebnisse

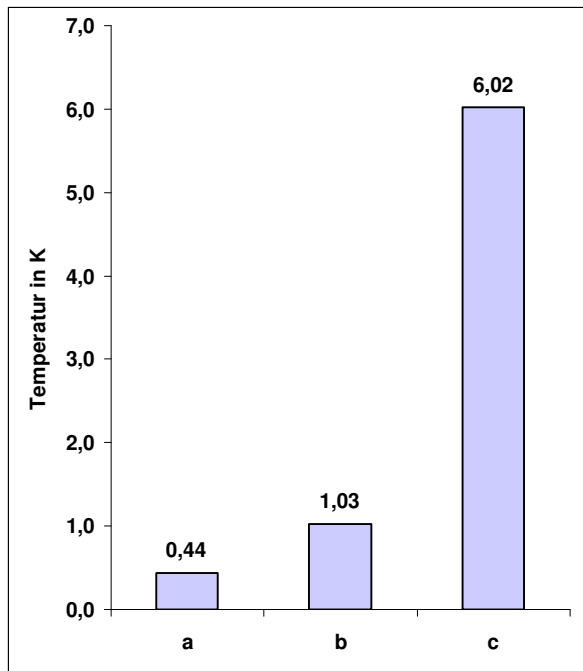


Abbildung 19: Temperaturentwicklung nach Exposition von SK-BR-3 Zellen für 150 Sekunden im magnetischen Wechselfeld (H: 11 kA/m; f: 410 kHz) nach Behandlung mit den funktionalisierten Sonden. a) Messung von $6,25 \times 10^7$ nativen SK-BR-3 Zellen; b) Messung der Zellen nach Behandlung mit funktionalisierten Isotyp-Sonden; c) Messung der Zellen nach Behandlung mit funktionalisierten Her-2-Sonden.

6. Diskussion

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen an Makrophagen gelang der Nachweis einer Abhängigkeit zwischen der Eisenoxidmenge in den Zellen, durch unspezifische Aufnahme des magnetischen Materials und der Inkubationszeit. Die aufgenommenen Partikel führten zu deutlichen Temperaturerhöhungen bei den Messungen im magnetischen Wechselfeld.

Bei den Untersuchungen zur spezifischen Bindung von magnetischem Material an Zellen kam zum einen die Mehrschrittmethode unter verschiedenen Behandlungsbedingungen und zum anderen die Einschrittmethode mit drei unterschiedlichen Sonden zum Einsatz. Unter Verwendung der Mehrschrittmethode fand sich am Endothelzellmodell der SVEC4-10 Zellen eine Abnahmetendenz der Eisenoxidkonzentration in den Zellen mit zunehmender Behandlungsdauer mit dem Ferrofluid unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Zur Behandlung von Zellen mit der Einschrittmethode konnten drei Sonden kreiert werden. Der Einsatz der Sonden zeigte eine spezifische Anlagerung von Nanopartikeln an die Zellen, es ergaben sich jedoch Unterschiede im Bindungsverhalten der Sonden. Messungen im magnetischen Wechselfeld konnten, in Abhängigkeit von den verwendeten Methoden, Unterschiede in den Temperaturentwicklungen der behandelten Zellen zeigen.

6.1. Unspezifische Aufnahme von magnetischen Nanopartikeln

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur unspezifischen Aufnahme von Ferrofluiden in Makrophagen zeigten eine Zunahme der Eisenoxidmenge in den Zellen mit längerer Inkubationsdauer. Diese Beobachtung konnte sowohl für jede einzelne Zelle als auch für die gesamten Versuchansätze verdeutlicht werden. Das Datenmaterial wies Schwankungen der Eisenoxidmengen auf, was zu den dargestellten hohen Standardabweichungen führte. Eine mögliche Begründung hierfür kann in der Sterilisation der Ferrofluide vor der Zellbehandlung gefunden werden. Durch die hohen Sterilisationstemperaturen kam es zu Flüssigkeitsverlusten in den Ferrofluiden und so zu einer Konzentrationserhöhung der Eisenoxidgehalte. Die Überprüfung dieser Konzentrationsveränderungen erfolgte stichprobenartig mittels AAS, Abweichungen zwischen einzelnen Ferrofluidproben wurden nicht analysiert. Ebenso

6. Diskussion

können zum einem Pipetierfehler beim Umgang mit den magnetischen Nanopartikeln zum anderen Verluste von magnetisch markierten Zellen bei den Waschvorgängen oder beim Abschaben der Zellen vom Flaschenboden zu Schwankungen der Eisenoxidgehalte geführt haben. Das Abschaben kann aber auch den Austritt von magnetischem Material aus den Zellen durch Irritation der Zellmembran hervorgerufen haben. Durch mehrfaches Waschen sollte jedoch eine Verringerung der frei vorliegenden Partikel erreicht werden, eine vollständige Entfernung wurde nicht untersucht. Eine Beeinflussung der Zellvitalität oder der Aufnahmefähigkeit der Makrophagen durch eine Kontamination mit Mycoplasmen wurde mittels DAPI-Test mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur unspezifischen Bindung an Makrophagen sind, trotz der beschriebenen Fehlerquellen, die durch Waschvorgänge und dreifache Versuchsausführung minimiert wurden, als zuverlässig anzusehen.

Der deutliche Anstieg der Eisenoxidgehaltkonzentration in den Zellen mit zunehmender Inkubationszeit (bis zu 12h) um etwa Faktor 6 ist das Ergebnis der unspezifischen phagozytosebedingten Aufnahme des Ferrofluids in die Makrophagen. In Untersuchungen von Wilhelm et al. (2002) ebenfalls an Mausmakrophagen, die mit magnetischen Nanopartikeln (Hülle aus DMSA (dimercaptosuccinicacid), bis zu 24h) behandelt wurden, konnte eine Zunahme der Eisenmenge in den Zellen durch unspezifische Aufnahme der Partikel um etwa Faktor 8 ermittelt werden. Der größere Anstieg der Eisenmenge in den Zellen in Untersuchungen von Wilhelm lässt sich vermutlich auf die längere Behandlungsdauer von 24h, verglichen mit der Dauer von 12h in der hier vorliegenden Studie, erklären.

Die Quantifizierung der Eisenaufnahme in die Makrophagen erfolgte in dieser Arbeit mit der Atomabsorptionsspektrometrie. Wilhelm et al. (2002) dagegen verwendeten eine Methode namens Magnetophorese und untersuchten die Partikelaufnahme ebenfalls mittels Elektronenmikroskopie. Hierbei konnte die Anlagerung der Nanopartikel an die Zellen über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der Plasmamembran und den Partikeln nachgewiesen werden. Die Nanopartikel wurden in „frühen“ Endosomen eingeschlossen und fusionierten im Zytoplasma zu „späten“ Endosomen oder Lysosomen. Vergleichbare Mechanismen der Partikelaufnahme und Prozessierung in den Makrophagen in der hier vorliegenden Arbeit sind vorstellbar. Eine vergleichbare Untersuchung z.B. mittels Elektronenmikroskopie

6. Diskussion

hätte jedoch den Rahmen dieser Arbeit gesprengt und bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten.

In den durchgeführten Versuchen dieser Studie blieb das Erreichen eines Sättigungsbereiches der Partikelaufnahme in die Makrophagen aus. Die Eisenoxidkonzentration in den Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (bis 12h) mit den Nanopartikeln stieg hierbei stetig an (siehe oben). Untersuchungen von Wilhelm et al. (2002) zeigten dagegen, neben der Abhängigkeit der Partikelaufnahme der Makrophagen von der Inkubationszeit, ebenfalls eine Abhängigkeit von der Partikelkonzentration im extrazellulären Medium. Es zeigte sich hierbei mit zunehmender Dauer der Behandlung (bis zu 24h) eine Sättigung der Aufnahmefähigkeit der Zellen. Eine denkbare Ursache für diese unterschiedlichen Tendenzen ist die kürzere Behandlungszeit von nur 12h in dieser Arbeit im Gegensatz zu 24h in der Arbeit von Wilhelm. Tendenziell ist eine Sättigung der Aufnahme für längere Behandlungszeiten durchaus denkbar. Hierzu müssten weiterführende Experimente durchgeführt werden.

Eine weitere Erkenntnis der Untersuchungen war die Zunahme der Makrophagenzellzahl mit längerer Behandlungsdauer. Die hierbei mittels der Thoma Zählkammer ermittelten Zellzahldaten, wiesen trotz gleicher Aussatzzellzahlen und Behandlungsbedingungen eine Schwankungsbreite auf. Hierfür kommen Fehler bei der verwendeten Zählmethode, Pipetierfehler bei der Verteilung der Zellsuspension und Wachstumsschwankungen, die bei der Arbeit mit biologischem Material bis zu 30% betragen können (Hilger, persönliche Mitteilung, 2004), in Betracht. Die Vermehrung der Zellen im Zeitintervall (12h) spiegelt jedoch deutlich die Wachstumsdynamik der Makrophagen wieder und ließ sich ebenfalls in drei Experimenten bestätigen.

Das zunehmende Wachstum der Makrophagen innerhalb der Behandlungsdauer lässt die Vermutung zu, dass das Ferrofluid keinen schädigenden Einfluss auf die Zellvitalität genommen hat. Die Zunahme der Zellen im Behandlungsintervall führte zu einer Steigerung des Aufnahmepotentials der Makrophagen für das Ferrofluid. Die Abhängigkeit zwischen Zellwachstum und Aufnahmepotential von Zellen für das magnetische Material wurde in Untersuchungen von Moore et al. (2000) analysiert. Hierbei wurde neben der Aufnahme der Partikel durch verschiedene Zelllinien, das Wachstum der Zellen während der Behandlung beobachtet. Es konnte ein Zusammenhang zwischen Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen und gesteigerter

6. Diskussion

Aufnahme von Nanopartikeln festgestellt werden. Eine hohe Verdopplungsrate korrelierte hierbei positiv mit einer erhöhten Aufnahme von Nanopartikeln. Daher lässt sich in den durchgeführten Untersuchungen die Steigerung der Eisenoxidgehaltmenge in den Makrophagen zum einen durch die Zunahme der Zellen, und damit der potentiellen Nanopartikelaufnehmer und zum anderen durch die längere Darbietung der Partikel mit zunehmender Inkubationsdauer erklären.

6.2. Spezifische Aufnahme von Ferrofluiden mit der Mehrschrittmethode

In Untersuchungen zur zeitlichen Dynamik der Partikelaufnahme am Endothelzellmodell der SVEC4-10 Zellen unter Einsatz der Mehrschrittmethode (biotinylierte CD106-Antikörper und streptavidinhaltiges Ferrofluid, jeweils Behandlungsdauer 30, 60, 90 min) zeigte sich eine Abnahme der Eisenoxidgehaltmenge in den Zellen in Abhängigkeit von der Behandlungszeit mit den Komponenten. Diese Abnahmetendenz mit zunehmender Inkubationsdauer bestätigte sich im Wiederholungsversuch, der wie das vorherige Experiment mit sterilen, mykoplasmenfreien Zellen durchgeführt wurde.

Die gefundene Abnahme der Eisenoxidgehaltmenge der Zellen basiert vermutlich auf rezeptorvermittelten Endozytosemechanismen. Diese energieverbrauchenden Vorgänge laufen, sobald ein Ligand an einen Rezeptor gebunden hat, rasch ab und ermöglichen so die zügige Aufnahme von Material in die Zelle (Darnell et al., 1994). So zeigte beispielsweise die Aufnahme von radioaktiv markiertem Transferrin durch rezeptorvermittelte Endozytose eine deutliche Erhöhung der intrazellulären Radioaktivität mit einem Maximalbereich von 15 - 30 min nach der Rezeptorbindung (Chiechanover et al., 1983). Ähnliche Zusammenhänge sind auch für eine Endozytose der an den CD106-Rezeptor gebundenen biotinylierten Antikörper denkbar. Theoretisch wird eine wiederholte Neubesetzung von Rezeptoren mit den Antikörpern durch das begrenzte Vorkommen beider Komponenten limitiert. Mit zunehmender Dauer der Antikörper Behandlung sinkt also seine Präsenz auf der Zelloberfläche. Dies führt zu einer Verminderung der Bindungsstellen für die magnetischen Nanopartikel mit zunehmender Behandlungszeit. Es ist denkbar, dass diese Prozesse eine Rolle bei der Abnahme der Eisenoxidgehalte in den Zellen in

6. Diskussion

dieser Arbeit gespielt haben. Die Zusammenhänge müssen jedoch in weiterführenden Untersuchungen bestätigt werden.

Im Gegensatz zur antikörpervermittelten Partikelaufnahme in die Endothelzellen im Rahmen der Mehrschrittmethode, die zu einer Eisenoxidabnahme in den Zellen führte, zeigte die zeitabhängige Inkubation der Zellen ausschließlich mit dem streptavidinhaltigen Ferrofluid eine Zunahme der Eisenoxidmenge. Die hierbei ermittelten relativ hohen Eisenoxidwerte, vor allem nach 60 min Behandlungsdauer, können auf Wechselwirkungen zwischen den Hüllmolekülen des Ferrofluids zurückzuführen sein. Es kann durch diese Reaktionen zur Zusammenlagerung von Partikel (Odenbach, 2001) und damit zu einer Konzentrationserhöhung kommen. Weitere Ursachen, die zu einer Veränderung der Partikel geführt haben können, sind bisher nicht hinreichend geklärt.

Die zeitabhängige Steigerung der Eisenoxidmenge nach Behandlung der SVEC4-10 Zellen mit dem Ferrofluid lässt sich auf eine unspezifische Anlagerung und Aufnahme des magnetischen Materials zurückführen. In Untersuchungen von Jugminder et al. (2003) an MCF7 Zellen, die mit Tamoxifen beladenen magnetischen Nanopartikeln behandelt wurden, zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der Partikelaufnahme, bis nach ca. 2h eine Sättigung erreicht war. Diese Zellen, so die Vermutung, nahmen die Partikel durch adsorptive Pinozytose auf, da sie nicht zur Phagozytose befähigt sind. Die Partikelaufnahme durch diesen Prozess der unspezifischen Endozytose ist durchaus auch auf die SVEC4-10 Zellen übertragbar, da sie ebenfalls nicht speziell zur Phagozytose befähigt sind. Untersuchungen in der hier vorliegenden Arbeit zur unspezifischen Anlagerung von Nanopartikeln an phagozytierende Makrophagen konnten ebenfalls die Zunahme der Konzentration an magnetischem Material in den Zellen mit längerer Behandlungszeit verzeichnen. Durch diese vergleichbaren Ergebnisse lassen sich die gefundenen Daten bestätigen.

Die unspezifische Anlagerung der Partikel an die Endothelzellen in der hier vorliegenden Studie kann zum einen über die Streptavidin Komponente der magnetischen Nanopartikel zum anderen über die Carboxymethyldextranhülle der Partikel vermittelt wurden sein. Da jedoch die Biotin-Avidin-Bindung als sehr stabil und hoch affin gilt ($K_d = 10^{-15}$ M) (Bayer et al., 1979; Jenne et al., 1999) und eine hohe Spezifität aufweist (Bayer et al., 1979), ist eine unspezifische über die Streptavidin Komponente der Nanopartikel vermittelte Anlagerung unwahrscheinlich. Die unspezifische Bindung erfolgte am ehesten über die Carboxymethyldextranhülle

6. Diskussion

der Partikel (Kießling, 2002). Die Ergebnisse von Kießling (2002) am gleichen Zellsystem der SVEC4-10 Zellen zur spezifischen und unspezifischen Bindung von Streptavidin gekoppelten Nanopartikeln zeigen in beiden Fällen eine Zunahme der Eisenoxidmenge in den Zellen. In der Arbeit von Kießling (2002) wurde eine Begünstigung der unspezifischen Anlagerung der magnetischen Nanopartikel durch „das statische Versuchssystem“, bei dem eine Ablagerung der Partikel auf die Zellen stattfand, vermutet. Um solche Interaktionen des Ferrofluids mit den Zellen zu verringern und eine Sedimentation der Zellen zu vermeiden, wurden in der vorliegenden Arbeit die Ansätze unter leichtem Schütteln inkubiert.

Die gleichen Tendenzen bei der unspezifischen Bindung am gleichen Zellsystem (Zunahme Eisenoxidmenge beide Studien) sind wie bereits beschrieben durch die unspezifische Endozytose der Partikel zu erklären. Die gegenläufigen Bindungstendenzen bei der spezifischen Bindung in beiden Arbeiten (Kießling Zunahme, vorliegenden Studie Abnahme der Eisenoxidmenge) sind im Zusammenhang mit dem veränderten Versuchssystem zu sehen.

Die Abnahme der Eisenoxidmenge in den Zellen nach Inkubation mit biotinylierten Antikörpern und Streptavidin gekoppelten Nanopartikeln bestätigte sich in weiteren Untersuchungen zur spezifischen antikörpervermittelten Bindung von magnetischem Material mit der Mehrschrittmethode (siehe unten). Die Kontrolluntersuchungen mit Isotyp-Antikörpern zeigten dabei nur eine geringe unspezifische Anlagerung. Somit ist die Abnahmetendenz der Eisenoxidmengen in den Zellen durch eine spezifische CD106-rezeptorvermittelte Bindung und Internalisierung der Partikel am wahrscheinlichsten zu erklären.

Die Abnahme der Eisenoxidmengen in den Endothelzellen in Abhängigkeit von der Behandlungszeit mit dem Ferrofluid bei gleichbleibender Antikörperbehandlung zeigte sich in Untersuchungen an SVEC4-10 Zellen unter Einsatz der Mehrschrittmethode (biotinylierte CD106-Antikörper, Inkubationsdauer 30 min und streptavidinhaltiges Ferrofluid, Behandlungsdauer 30, 60, 90 min). Diese Abnahmetendenz bestätigte sich im Wiederholungsversuch.

Die Untersuchung zur Bindungsspezifität mit einem Isotyp-Antikörper und dem Ferrofluid unter gleichen Bedingungen zeigte zum einen eine deutlich geringere Beladung der Endothelzellen mit Eisenoxid im Vergleich zu den Werten nach der CD106-Antikörper-Behandlung. Zum anderen konnte auch tendenzielle eine

6. Diskussion

Zunahme der Eisenoxidgehalte in den Zellen mit zunehmender Ferrofluid-Behandlungsdauer beobachtet werden.

Die Eisenoxidgehalte in den Zellen und die ermittelte Abnahmetendenz lassen sich auf Grundlage dieser Ergebnisse auf eine spezifische rezeptorvermittelte Bindung des magnetischen Materials zurückführen.

Die erneut ermittelte Abnahmetendenz der Eisenoxidgehalte in den Zellen trotz gleicher Antikörperbehandlung gibt einen Hinweis darauf, dass neben Endozytosemechanismen auch andere Zellvorgänge Einfluss auf das magnetische Material haben. Bei der Antikörperinkubation ist das Auftreten von Endozytosevorgängen (innerhalb von 15 - 30 min; Chiechanover et al., 1983), die zu einer Reduktion der Rezeptorzahl und der gebundenen Antikörper durch Aufnahme in die Zellen führten, durchaus vorstellbar. Da dieser Befund alle Zellen in den Ansätzen betraf, ist es denkbar, dass die Antikörperverfügbarkeit am CD106-Rezeptor nach 30 min in den Versuchsansätzen durchaus vergleichbar war. Damit war vermutlich ein vergleichbarer Ausgangspunkt zur Ferrofluidbindung an die antikörperbesetzten Rezeptoren geschaffen. Nach der Bindung der Nanopartikel über das Biotin-Streptavidin-System an die Antikörper und somit an die Zellen, unterliegen diese Komplexe ebenfalls Endozytosemechanismen, die zu einer Aufnahme des magnetischen Materials in die Zellen führen. Da die Bindung der Nanopartikel durch das limitierte Vorkommen antikörperbesetzter Rezeptoren begrenzt ist, kommt es zur Stagnation der Partikelaufnahme. Es ist vorstellbar, dass auf Grundlage der bereits beschriebenen zeitlichen Dynamik der Endozytosevorgänge (Aufnahme innerhalb von 15 – 30 min) die Stagnation in diesem zeitlichen Rahmen auftritt. Eine weitere Aufnahme von Ferrofluid ist durch das Fehlen antikörperbesetzter Rezeptoren nur eingeschränkt möglich. Hieraus ergäbe sich eine Erklärung für eine gleichbleibende nicht ansteigende Eisenoxidgehalte in den Zellen aber keine Begründung für eine Abnahme. Daher müssen weitere Vorgänge Einfluss auf das magnetische Material in den Zellen haben. Es besteht die Möglichkeit, dass hierbei Ausschleusungsprozesse (Exozytosemechanismen) eine Rolle spielen. Exozytosevorgänge sind z.B. beim Rezeptorrecycling von großer Bedeutung, aber auch Makromoleküle können die Zellen über diesen Prozess verlassen (James Darnell et al., 1994). Ob Sekretionsvorgänge der Zellen zur Abnahme der Eisenoxidgehalte geführt haben, muss jedoch in weiteren Experimenten Bestätigung finden.

6. Diskussion

In Untersuchungen zum Einfluss der Inkubationstemperatur auf der Partikelaufnahme am Endothelzellmodell der SVEC4-10 Zellen unter Einsatz der Mehrschrittmethode (biotinylierte CD106-Antikörper, Behandlungsdauer 30 min bei 4°C und streptavidinhaltiges Ferrofluid, Behandlungsdauer 30, 60, 90 min bei 37°C) zeigte sich eine Abnahme der Eisenoxidgehalt in den Zellen mit zunehmender Ferrofluid-Behandlungsdauer. Diese Abnahmetendenz bestätigte sich im Wiederholungsversuch. Die Kontrolluntersuchung mit einem Isotyp-Antikörper und dem Ferrofluid unter gleichen Inkubationsbedingungen zeigten neben einer geringeren Eisenoxidbeladung der Endothelzellen, verglichen mit den Werten nach der CD106-Antikörper-Behandlung, einen relativ konstanten Eisenoxidgehalt in den Zellen.

Die erneut aufgetretene Abnahmetendenz der Eisenoxidgehalt in den Zellen nach antikörpervermittelter spezifischer Nanopartikelaufnahme stand im Gegensatz zu den erwarteten Tendenzen. Durch die Verringerung der Behandlungstemperatur des Antikörpers auf 4°C sollten Endozytoseprozesse am Rezeptor und die damit verbundene Antikörperinternalisierung vermindert werden. Durch diese Behandlung sollte eine gleichbleibende Antikörperbesetzung am Rezeptor und damit eine vergleichbare Ausgangsposition für die Bindung des magnetischen Materials in allen Zellen erreicht werden. Diese Erwartungen begründen sich darauf, dass die Endozytosevorgänge energieverbrauchend sind und bei 37°C optimal ablaufen, jedoch bei 4°C nur eine Ligandenbindung aber keine Internalisierung erfolgen kann. Die Aufnahme von an Rezeptor gebundenen Liganden erfolgt erst oberhalb von 4°C (James Darnell et al., 1994). In Untersuchungen von Miltenyi et al. (1989) zur magnetischen Zellseparation wurden Zellen ebenfalls über Antikörper mit magnetischem Material markiert. Hierbei erfolgte die Antikörperbehandlung ebenfalls bei 4°C. Eine Internalisierung der antikörperbesetzten Rezeptoren war erst im Rahmen der Ferrofluidbehandlung bei 37°C möglich. Hierbei sollte es zur Aufnahme der rezeptorgebundenen Antikörper-Nanopartikel-Komplexe kommen. Limitiert war dieser Prozess durch das begrenzte Vorkommen von antikörperbesetzten Rezeptoren. Daher wurde mit einer relativ gleichbleibenden Eisenoxidgehalt in den Zellen nach der Ferrofluidinkubation gerechnet.

Die ermittelte Abnahme des Eisenoxidgehaltes in den Zellen unter beschriebenen Bedingungen widerlegte jedoch diese Vermutung. Sie lässt sich jedoch unter diesen Inkubationsbedingungen nicht mit Internalisierungsvorgängen am Rezeptor und der

Verminderung der Bindungsstellen erklären. Hierbei müssen wie bereits vermutet Ausschleusungsprozesse der Zellen verantwortlich sein. Diese Vorgänge sind bisher spärlich beschrieben und müssen in weiterführenden Experimenten näher beleuchtet werden.

6.3. Spezifische Aufnahme von Ferrofluiden mit der Einschrittmethode

Die Analyse der Aufnahmedynamik magnetischen Materials unter Einsatz der Einschrittmethode mit den CD106-Brückenmolekül-Sonden und den Endothelzellen der SVEC4-10 Zelllinie zeigte eine Abnahme der Eisenoxidgehaltkonzentrationen mit zunehmender Sondeninkubationsdauer. Diese Abnahmetendenz konnte im Wiederholungsexperiment erneut gezeigt werden, die Absolutwerte der Eisenoxidgehaltkonzentration in den Zellen waren jedoch geringer. In den Kontrolluntersuchungen mit den Isotyp-Brückenmolekül-Sonden konnten deutlich geringere Eisenoxidgehaltkonzentrationen in den Zellen verglichen mit den Mengen nach der CD106-Brückenmolekül-Sonden-Inkubation verzeichnet werden. Die Eisenoxidgehalte der Zellen waren trotz der verschiedenen Behandlungsdauern relativ konstant und zeigten keine Abnahmetendenz.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse sind die Eisenoxidgehalten in den Zellen und die ermittelte Abnahmetendenz auf eine spezifische Bindung und rezeptorvermittelte Internalisierung der Sonden zurückzuführen. Diese Abnahme der Eisenoxidgehaltmenge in den Zellen steht im Gegensatz zu den erwarteten Tendenzen. Es wurde ein ähnlicher Eisenoxidgehalt in den Zellen trotz unterschiedlich langer Behandlungszeiten erwartet. Diese Annahme begründet sich darauf, dass das spezifische Aufnahmepotential der Zellen durch die Anzahl der Rezeptoren und Sonden, deren Zahl bzw. Menge in den Ansätzen vergleichbar war, limitiert bzw. beeinflusst wird. Andere Einflüsse wie z.B. Endozytosevorgänge der Antikörper am Rezeptor wurde durch den Einsatz der Einschrittmethode mit den Sonden reduziert. Die Sonden ermöglichten eine Bindung und Internalisierung der Antikörper und Nanopartikel in einem Schritt in die Zellen. So zeigte die ermittelte Abnahmetendenz der Eisenoxidgehalte der Zellen erneut, dass nicht nur Endozytosevorgänge am Rezeptor, sondern auch Ausschleusungsvorgänge der Zellen die Partikelaufnahme beeinflussen. Diese Exozytosevorgänge führten in den Untersuchungen mit der

6. Diskussion

Mehrschritt- und auch der Einschrittmethode zu einer Abnahme der Eisenoxidgehalte in den Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Bei der unspezifischen Aufnahme von magnetischem Material in Zellen zeigt sich eine zeitabhängige Zunahme, diese ist jedoch in ihrem Umfang durchaus von der Zelllinie abhängig. So findet sich bei zur Phagozytose befähigten Zellen eine deutliche Zunahme der Eisenoxidmenge in Abhängigkeit von der Behandlungszeit, wie Untersuchungen von Wilhelm et al. (2002) und die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen. Diese Zunahme unterliegt einer Sättigung, die innerhalb von 24h auftritt (Wilhelm et al., 2002).

Im Rahmen der unspezifischen Aufnahme von magnetischem Material durch nicht speziell zur Phagozytose befähigte Zellen bestätigen die hier vorliegenden Analysen an Endothelzellen, im Rahmen der Kontrolluntersuchungen zur unspezifischen Bindung der Streptavidin gekoppelten Nanopartikel, und Untersuchungen von Jugminder et al. (2003) an MCF7 Zellen eine tendenzielle Zunahme der Partikelaufnahme mit der Zeit. Das Erreichen einer Sättigung trat nach Jugminder et al. (2003) jedoch bereits nach 2h ein. Demnach werden die Vorgänge der unspezifischen Anlagerung von Material an Zellen also hauptsächlich von der Einwirkzeit mit Erreichen einer Sättigung und der Zellart beeinflusst und sind unabhängig von Zielstrukturen der Zellen.

Im Gegensatz zu dieser unspezifischen Bindung zeigt die spezifische Bindung des magnetischen Materials an Zellen über den Prozess der rezeptorvermittelten Endozytose in der vorliegenden Arbeit eine zeitabhängige Abnahme der Eisenoxidgehalte in den Zellen. Hierbei spielen offensichtlich Internalisierungsvorgänge am Rezeptor und Ausschleusungsmechanismen der Zellen eine entscheidende Rolle. Die spezifische rezeptorvermittelte Bindung des magnetischen Materials an Zellen wird hierbei auch durch das begrenzte Vorhandensein von Zielstrukturen (Rezeptoren) limitiert.

6.4. Spezifische Aufnahme von Ferrofluiden unter Einsatz der Einschrittmethode mit funktionalisierten Sonden

Die Aufnahme von magnetischem Material nach Behandlung von SVEC4-10 Zellen mit funktionalisierten CD106-Sonden konnte durch Bestimmung der Eisenoxidmenge

6. Diskussion

und durch elektronenmikroskopische Aufnahmen gezeigt werden. Durch Untersuchung von nativen und mit funktionalisierten Isotyp-Sonden behandelten Zellen konnte die spezifische Anlagerung nachgewiesen werden. Die Eisenoxidgehalt in den Endothelzellen nach der spezifischen rezeptorvermittelten Bindung war im Vergleich zur Isotypkontrolle doppelt so hoch.

Ein Zusammenhang zwischen Zellzahl und aufgenommenen magnetischem Material konnte ebenfalls ermittelt werden. So fand sich bei der Behandlung von Endothelzellen, deren Zellzahl um 1,7 erhöht wurden war (von 3×10^7 auf 5×10^7 Zellen), eine 1,5-fach höhere Eisenoxidgehalt als in 3×10^7 behandelten Zellen (von 0,214 pg auf 0,306 pg pro Zelle). Die mit der Isotyp-Sonde behandelten Zellen zeigten jedoch hierbei ebenfalls einen hohen Eisenoxidgehalt. Dieser hohe Eisenoxidgehalt der Isotyp-Sonden-Probe lässt sich durchaus auf den Einfluss der bereits im Ergebnisteil beschriebenen Agglomerate zurückführen. Sie können durch Zusammenlagerung der funktionalisierten Nanopartikel durch Wechselwirkungen der Hüllmoleküle (Odenbach, 2001) entstehen. Durch vielfaches Waschen der Ansätze wurde eine Reduzierung der Agglomerate erreicht. Das Verbleiben von einigen zusammengelagerten Partikeln ist jedoch nicht auszuschließen. Dafür sprechen auch die unterschiedlichen Eisenoxidgehalte der entfernten Agglomerate der Ansätze, die nach den Waschungen ermittelt wurden (Agglomerate, Eisenoxidgehalt 25,6 µg CD106-Sonde bzw. 20,9 µg Isotyp-Sonde). So ist es durchaus möglich, dass verbliebene Agglomerate in der Isotyp-Sonden-Probe den Eisenoxidgehalt des Ansatzes verfälscht haben und die ermittelte Eisenoxidgehalt daher falsch hoch ist. Bei der Herstellung der Sonden zeigten sich Unterschiede im Proteingehalt der funktionalisierten CD106- bzw. Isotyp-Sonden. In wie weit diese einen Einfluss auf die Zellbindung und Aufnahme haben, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Dieser Ansatzpunkt ist derzeit Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Bei der Behandlung der Her-2-Rezeptor überexprimierenden Tumorzellen mit der funktionalisierten Her-2-Sonde konnte eine spezifische magnetische Markierung der Zellen erreicht werden. Die Inkubation dieser Zellen mit einer Isotyp-Sonde erbrachte eine geringere magnetische Markierung. Die Eisenoxidgehalt in den Zellen war nach Bindung der spezifischen funktionalisierten-Her-2-Sonde um ein Dreifaches höher als nach Bindung der Isotyp-Sonde. Die Her-2-Sonde eignet sich also zur spezifischen Markierung der Zielzellen.

6. Diskussion

Einfluss auf die Bindung der beiden Sonden (Her-2-Sonde, Isotyp-Sonde) kann deren unterschiedlicher Protein und Eisenoxidgehalt haben. So zeigte sich bei der Isotyp-Sonde ein geringerer Gehalt an Protein und Eisenoxid (Proteingehalt von 162,5 µg/ml und eine Eisenoxidkonzentration von 21,4 mg/ml) im Vergleich zur Her-2-Sonde (Proteingehalt von 385 µg/ml und ein Eisenoxidgehalt von 45,6 mg/ml). Diese Schwankungen sind durch das Herstellungsverfahren bedingt. Wie stark sich der Einfluss dieser Sondenunterschiede auf das beschriebene Ergebnis ausgewirkt hat, konnte in dieser Untersuchung nicht ausreichend geklärt werden. Hierzu müssen weitere Untersuchungen unter gleichen Bedingungen mit modifizierten Partikeln durchgeführt werden.

Bei der ermittelten dreifach höheren Eisenoxidmenge nach Anlagerung der spezifischen Her-2-Sonde verglichen mit der Isotyp-Sonde spielte die Problematik der Agglomerate und deren Einfluss auf das Versuchsergebnis eine untergeordnete Rolle. So findet sich bei der Eisenoxidanalyse der Agglomerate des Her-2-Sonden Ansatzes 32 mal mehr Eisenoxid als bei den Agglomeraten des Isotyp-Sonden Ansatz. Dennoch zeigt sich ein deutlich höherer Eisenoxidgehalt in den Zellen nach der Her-2-Sonden Inkubation als nach der Isotyp-Sonden Behandlung. So ist von einer magnetischen Markierung der Tumorzellen durch spezifische Anlagerung der Her-2-Sonde und nicht von einer Verfälschung durch Agglomerate der Sonden auszugehen.

Im Vergleich zu der hier vorliegenden dreifach höheren spezifischen Sonden Anlagerung an Zellen konnte in Untersuchungen von Kang et al. (2002) an HUVEC (humane-Umbilikalvenen-Endothelzellen) eine 50 fach höhere spezifische Bindung von Antikörper funktionalisierten Nanopartikel erreicht werden. Dieser deutliche Unterschied kann zum einen auf die verschiedenen Detektionsmethoden zurückzuführen sein. In der hier vorliegenden Studie diente der mit AAS ermittelte Eisenoxidgehalt der Zellen als Bezugsgröße. In den Untersuchungen von Kang et al. (2002) wurde die Bindungsspezifität unter anderem über die Anreicherung von radioaktiv markierten Antikörper-konjugierten-Nanopartikeln an die Zellen bestimmt. Ebenso bestehen Unterschiede bei den eingesetzten Zelllinien, zum einen Tumorzellen zum anderen humane Endothelzellen. Des weiteren können die differierenden Nanopartikel (Eisenoxidkern mit Carboxymethyldextranhülle und bei Kang et al. modifizierte „Cross-linked-Eisenoxide“) und Inkubationsbedingungen (vorliegende Studie 30min, 37°C, Kang et al., 1h, 37°C) zu den Unterschieden bei

6. Diskussion

der Bindungsspezifität geführt haben. In beiden Studien konnte aber eine deutliche rezeptorvermittelte Anlagerung des magnetischen Materials an die Zelloberfläche gezeigt werden.

Eine, wie in dieser Studie erreichte, spezifische magnetische Markierung von Tumorzellen konnte in Untersuchungen von Shinkai et al. (1994) ebenfalls gezeigt werden. Hierbei wurden Kolonkarzinomzellen mit Antikörper-konjugierten Magnetoliposomen, die einen Eisenoxidkern enthielten, spezifisch markiert. Dabei wurde eine 6 fach höhere Anlagerung der spezifisch bindenden Liposomen nach 4h Behandlungszeit im Vergleich zu den Kontrollen erreicht. Die Bezugsgröße war hierbei ebenfalls der mittels AAS bestimmte Eisenoxidgehalt der Zellen. Die doppelte so hohe spezifische Anlagerung (6 fach) in der Studie von Shinkai et al. im Vergleich zur vorliegenden Untersuchung der Her-2-Sonde an den SK-BR-3 (3 fach hohe spezifische Anlagerung) kann zum einen durch die unterschiedlichen Partikel mit ihren differierenden Oberflächen zum anderen durch die unterschiedlichen Tumorzelllinien und Behandlungszeiten bedingt sein.

Die Untersuchung mit den funktionalisierten Her-2-Sonde an SK-BR-3 Zellen verdeutlicht, dass eine spezifische Anlagerung von Nanopartikeln an Zellen und damit das Erreichen hoher Eisenoxidmengen in Zellen machbar ist. Weitere Untersuchungen unter vergleichbaren Bedingungen zur Verifizierung der gewonnenen Ergebnisse sind derzeit Gegenstand weiterer Analysen.

6.5. Temperaturmessung im Magnetwechselfeld

6.5.1. Unspezifische Bindung

Die Messungen der mit dem Ferrofluid behandelten Makrophagen im magnetischen Wechselfeld zeigten einen stetigen Anstieg der Temperatur in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. So konnte ein Vervierfachung der Temperatur zwischen der 2 und 12h Behandlung erreicht werden. Die Temperaturerhöhung der unbehandelten Kontrolle aus Zellen in Puffer war relativ konstant und machte ein Drittel (nach 2h) bzw. ein Dreizehntel (nach 12h) der Temperaturerhöhung aus.

Die Temperaturerhöhung wird also wenig von den Zellen selbst beeinflusst, sondern hängt von deren Eisenoxidgehalt ab, der wie bereits beschrieben ebenfalls mit zunehmender Inkubationsdauer ansteigt. Als Ursache des Temperaturanstieges der

6. Diskussion

nativen Zellen können durch Wirbelströme verursachte Ionenbewegungen in der Zell-Puffer-Lösung genannt werden. Der Einfluss der Variation der Probenplatzierung auf die Messungen wurde durch die dreifach Ausführung der Experimente und einen reproduzierbaren Versuchsaufbau minimiert. Die Einflüsse von Umgebungstemperatur und Luftbewegungen wurden durch das 20 minütige Angleichen der Proben an die Umgebungsbedingungen und dem Erreichen des thermischen Gleichgewichtes verringert. Die ermittelten Standardabweichungen der Temperaturwerte sind auf die bereits beschriebenen Schwankungen der Eisenoxidkonzentrationen in den Zellen zurückzuführen. Denn die Zunahme der Eisenoxidkonzentration in den Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit steht im direkten Zusammenhang mit der Erhöhung der Temperatur. Die zunehmende Anreicherung von magnetischem Material in den Zellen führt zu einer höheren Temperaturentwicklung im magnetischen Wechselfeld. Es kann also ein Zusammenhang zwischen der steigenden Zellzahl, der zunehmenden Eisenoxidmenge in den Makrophagen und der Temperaturerhöhung im MWF in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer mit dem Ferrofluid festgestellt werden.

6.5.2. Spezifische Bindung von Ferrofluiden mit der Mehrschritt- und Einschrittmethode

Bei den Messungen im magnetischen Wechselfeld konnte weder nach Inkubation der Endothelzellen mit den biotinylierten CD106-Antikörpern und dem streptavidinhaltigen Ferrofluid unter Verwendung der Mehrschrittmethode und unter Variation der Behandlungsbedingungen noch nach Inkubation der Endothelzellen unter Einsatz der Einschrittmethode mit der CD106-Brückenmolekül-Sonde eine Temperaturerhöhung verzeichnet werden. Die magnetisch markierten Zellen wiesen im Vergleich zu den nativen Zellkontrollen und den mit biotinylierte Isotyp-Antikörpern und streptavidinhaltigen Ferrofluid bzw. mit der Isotyp-Sonde behandelten Zellen keinen nachweisbar höheren Temperaturanstieg auf. Es konnte also unter den verwendeten Methoden keine ausreichende magnetische Markierung der Zellen erreicht werden, die zu einer Temperaturerhöhung bei den Messungen im Wechselfeld führen konnte.

Die ermittelten Unterschiede bei den Eisenoxidsmengen in den nativen bzw. mit Antikörpern (CD106 und Isotyp) und Ferrofluid bzw. Sonden behandelten Zellen

6. Diskussion

spiegeln sich nicht in den Temperaturdaten wieder. Der Eisenoxidgehalt in den Zellen reichte unter den verwendeten Parametern nicht für einen Temperaturanstieg aus. Ebenfalls könnte ein geringeres Wärmegenerierungspotential des verwendeten streptavidinhaltigen Ferrofluids für die geringen Temperaturanstiege mit verantwortlich sein. Dieses Potential wurde in dieser Studie jedoch nicht untersucht.

6.5.3. Spezifische Bindung von funktionalisierten Sonden unter Einsatz der Einschrittmethode

Die Wärmebehandlung der mit den funktionalisierten CD106-Sonden markierten Endothelzellen zeigte einen Temperaturunterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen. Eine Temperaturdifferenz zwischen den mit den funktionalisierten CD106-Sonden und den Isotyp-Sonden inkubierten Zellen konnte jedoch nicht ermittelt werden.

Die Temperaturdifferenz (ca. 1K) zwischen den nativen und behandelten Zellen ist auf den deutlichen Unterschied im Eisenoxidgehalt der Proben zurückzuführen. Die Differenzen im Eisenoxidgehalt der spezifisch und unspezifisch magnetisch markierten Zellen reichten nicht für einen nachweisbaren Temperaturunterschied aus.

Zu einem deutlichen Temperaturanstieg führte die magnetische Wärmebehandlung von Tumorzellen nach Markierung mit den funktionalisierten Her-2- bzw. Isotyp-Sonden. Hierbei konnte sowohl eine Temperaturdifferenz zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen (ΔT 5,6 K) als auch zwischen den spezifisch und unspezifisch magnetisch markierten Zellen (ΔT 5 K) ermittelt werden. Diese Temperaturanstiege nach Behandlung der Zellen im Wechselfeld korrelieren hierbei mit den Eisenoxidgehalten der Zellansätze. Die spezifisch markierten Tumorzellen weisen den höchsten Eisenoxidgehalt auf, und zeigen ebenfalls den höchsten Temperaturanstieg.

So zeigt sich ein direkter Zusammenhang zwischen Eisenoxidgehalt der Zellen und Temperaturanstieg, eine hohe magnetische Markierung der Zellen ermöglicht eine hohe Temperatúrausbeute.

Im Gegensatz zu der hier vorliegenden *in vitro* Studie zur magnetischen Markierung von Tumorzellen wurden bei *in vivo* Untersuchungen von Shinkai et al. (2001) Nierenzelltumor-tragende Mäuse mit Antikörper-gekoppelten-Magnetoliposomen

6. Diskussion

behandelt. Hierbei wurde nach 48h eine spezifisch vermittelte Anreicherung von 1,5 mg Eisenoxid in 0,2g Tumorgewebe (Zellzahl unbekannt) festgestellt. Bei der Exposition dieser mit Eisenoxid beladenen Tumoren im MWF (H: 30,6 kA/m, f: 118 kHz) für 30 min konnte eine Temperaturerhöhung von 6 K mittels Thermoelement aufgezeichnet werden. Ein Vergleich der erreichten Temperaturerhöhungen, die trotz stark differierender Eisenoxidmengen nach spezifischer Anlagerung (77,6 µg im Ansatz in der vorliegenden Studie und 1,5 mg im Tumor bei Shinkai et al.) mit 5 K bzw. 6 K ähnlich hoch waren, ist jedoch aufgrund der verschiedenen Versuchsbedingungen nicht möglich. *In vitro* und *in vivo* Versuchsergebnisse sind nicht vergleichbar, da es unter der *in vivo* Situation zu einem Abtransport von Wärme über den Blutstrom kommt, was zu einer Verringerung der gemessenen Temperaturwerte führt.

So sollte es Ziel weiterer Untersuchungen sein, in der *in vitro* Situation eine Steigerung der Temperaturerhöhung zu erreichen, um in zukünftigen *in vivo* Experimenten ebenfalls einen Temperaturanstieg verzeichnen zu können.

7. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine spezifische selektive Markierung von Zellen mit magnetischen Nanopartikeln über Antikörper prinzipiell möglich ist. In den durchgeführten *in vitro* Analysen konnte sowohl unter Einsatz der Mehrschrittmethode als auch unter Verwendung der Einzelschrittmethode eine spezifische magnetische Markierung der Endothel- bzw. Tumorzellen erreicht werden. Des Weiteren wurden Unterschiede der Partikelaufnahme nach unspezifischer bzw. spezifischer Bindung des magnetischen Materials an die Zellen festgestellt. So haben zelluläre Prozesse wie Endozytose und Exozytose bei der spezifischen rezeptorvermittelten Partikelaufnahme vermutlich einen bedeutenden Einfluss auf die intrazellulär verbleibende Menge magnetischen Materials. Des Weiteren konnten die Untersuchungen zeigen, dass erst eine hohe magnetische Beladung einer großen Zellzahl bei der Exposition im magnetischen Wechselfeld zu einer Temperaturerhöhung führen kann.

So ist die spezifische Beladung von Zellen mit Nanopartikeln und das Erzielen eines Temperaturanstiegs nach Exposition im magnetischen Wechselfeld in der *in vitro* Situation ein Anfangspunkt auf dem langen Weg zur klinischen Anwendung dieser Methode der magnetischen Wärmebehandlung, der bereits weitere interessante Fragen aufwirft.

So bietet die Aufklärung der zellulären Mechanismen im Zusammenhang mit der rezeptorvermittelten Nanopartikelaufnahme Raum für weitere Forschungsansätze. Es ist in Hinblick auf zukünftige *in vivo* Anwendungen bedeutend einen Einblick in das intrazelluläre Processing, dem die Nanopartikel unterliegen, zu haben.

Ebenso ist es entscheidend weitere Zielstrukturen, d.h. Rezeptoren auf der Zelloberfläche von verschiedenen Tumorzellen bzw. Tumorgefäßzellen zu entdecken. Je mehr Zielmoleküle bekannt sind, desto breiter stellt sich die Angriffsfläche zur Tumorbekämpfung dar.

Mit der Etablierung neuer Zielantigene ist die Weiterentwicklung der Sondenmodelle verknüpft. Hierbei ist die Kopplung möglichst vieler antigenerkennender Strukturen an potente Nanopartikel erstrebenswert. Ebenso bieten die Verbesserung der Biokompatibilität und der Spezifität weitere Forschungsaspekte.

In zukünftigen Untersuchungen *in vivo* an Mäusen werden neben der Problematik des Wärmeabtransportes durch den Blutstrom weitere Fragen auftauchen und zu

7. Schlussfolgerung

beantworten sein. Ebenfalls ist eine *in vitro* Anwendung der antikörpervermittelten Nanopartikelkopplung an humanen Tumor- und Gefäßzellen durchzuführen, da eine *in vivo* Anwendung am Menschen das Ziel dieser Methode der magnetischen Wärmebehandlung darstellt. Bis zu dieser *in vivo* Anwendung am Menschen und der Etablierung eines Therapieplans zur Tumorbekämpfung ist es jedoch noch ein weiterer Forschungsweg. An dessen Ende könnten intelligente Nanopartikel mit einer eigenen Zielerkennung und dem Potential der Zielzerstörung stehen.

8. Literaturverzeichnis

- Bayer EA, Skutelsky E and Wilcher M** (1979) The Avidin-Biotin Complex in Affinity Cytochemistry. *Methods in Enzymology* 62: 308-315.
- Bradford M M** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Connolly JL and Schnitt SJ** (1995) Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol* 26: 86-91.
- Ciechanover A, Schwartz AL, Dautry-Varsat A and Lodish HF** (1983) Kinetics of internalization and recycling of transferrin and the transferrin receptor in a human hepatoma cell line. *Journal of Biological Chemistry* 258: 9681-9.
- Darnell J, Lodish H, Baltimore D** (1994) *Molekulare Zellbiologie*; Ins Dt. übersetzt von L. Träger unter Mitw. von R. Träger, Berlin, New York, de Gruyter, Auflage 2, S. 643-662.
- Deutsche Krebsgesellschaft e. V.**, Welche Behandlung? Neue Methoden! Web – Seite vom 15.11.2001, Einsehbar unter <http://info.krebsgesellschaft.de>, Besucht am 10.03.2004.
- FacsLab Uni - Mainz**, FACS. Web-Seite vom 11.07.2005, Einsehbar unter <http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp>, Besucht am 20.07.2005
- Fritsche C** (2004) persönliche Mitteilung, Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie (IDIR), Erlanger Allee 101, 07747 Jena.
- Frühauf K** (2002) Evaluierung von temperaturrelevanten Parametern zur lokalen Erwärmung von Geweben mittels magnetischer Thermoablation. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität, Jena.
- Grana C, Chinol M, Magnani P, Corti A, Sidoli A, Siccardi AG and Paganelli G** (1996) In vivo tumor targeting based on the avidin - biotin system. *Tumor Targeting* 2: 230-239.
- Hergt R, Andrä W, d'Ambly CG, Hilger I, Kaiser WA, Richter U und Schmiedt HG** (1998) Physical Limits of Hyperthermia Using Magnetite Fine Particles. *IEEE Transactions on Magnetism* 34: 3745-3754.

8. Literaturverzeichnis

- Hergt R** (2002) persönliche Mitteilung Dissertation Kießling (2003), Institut für physikalische Hochtechnologie (IPHT), Winzerlaer Str. 10, 07745 Jena.
- Hiergeist R** (2003) persönliche Mitteilung Dissertation Kießling (2003), Institut für physikalische Hochtechnologie (IPHT), Winzerlaer Str. 10, 07745 Jena.
- Hilger I** (2004) persönliche Mitteilung, Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie (IDIR), Erlanger Allee 101, 07747 Jena.
- Hilger I, Andrä W, Bähring R, Daum A, Hergt R und Kaiser WA** (1997) Evaluation of Temperature Increase with Different Amounts of Magnetite in Liver Tissue Samples. *Invest Radiol* 35: 170-179.
- Hilger I, Andrä W, Hergt R, Hiergeist R, Schubert H und Kaiser WA** (2001a) Electromagnetic Heating of Breast Tumors in Interventional Radiology: In Vitro and in Vivo Studies in Human Cadavers and Mice. *Radiology* 218: 570-575.
- Hilger I, Frühauf S, Andrä W, Hiergeist R, Hergt R und Kaiser WA** (2001b) Magnetic Heating as a Therapeutic Tool. *Thermology international* 11: 130-136.
- Högemann D, Bäsillon JP, Weissleder R** (2001) Molekulare Bildgebung in der Berlin 2001, 41: 116-120.
- Issels RD, Prenninger SW, Nagele A et al** (1990) Ifosfamide plus etoposide combines with regional hyperthermia in patients with locally advanced sarcomas: A phase II study. *J Clin Oncol* 8: 1818-1829.
- Jenne A and Famulok M** (1999) Disruption of the streptavidin interaction with biotinylated nucleic acid probes by 2-mercaptoethanol. *Bio Techniques* 26: 249.
- Jugminder SC and Mansoor MA** (2003) Cellular Uptake and Concentrations of Tamoxifen Upon Administration in Poly(ϵ -caprolactone) Nanoparticles. *AAPS PharmSci* 2003; 5(1) Article 3: 28-34.
- Kang HW, Josephson L, Petrovsky A, Weissleder R and Bogdanov A** (2002) Magnetic Resonance Imaging of Inducible E-Selectin Expression in Human Endothelial Cell Culture. *Bioconjugate Chem.* 13: 122-127.
- Keil J** (2004) In-vitro-Untersuchung eines Zellmodells für die Entwicklung von Sonden in der molekularen Bildgebung und Therapie: Expression endothelialer Marker in einer Endothelzelllinie. Dissertation, Friedrich Schiller Universität, Jena.
- Kiesling A** (2003) Bindungsfähigkeit und Wärmeausbeute von magnetischen Nanopartikeln an Endothelzellen in Kultur. Dissertation, Friedrich Schiller Universität, Jena.

8. Literaturverzeichnis

- Knowlton KU et al.** (1996) A mutation in the puff region of VP2 attenuates the myocarditic phenotype of an infectious cDNA of the woodruff variant of coxsackievirus B3. *J. Virol.* 70: 7811-7818.
- Madersbacher S und Marberger M** (1996) Minimal invasive therapy of benign prostatic hyperplasia. *Wien Med Wochenschr* 146: 675-680.
- Martiny-Baron G and Marme´ D** (1995) VEGF-mediated tumor angiogenesis: a new target for cancer therapy. *Curr Opin Biotechnol* 6: 675-680.
- Medicine-Worldwide**, Brustkrebs. Web-Seite vom 20.01.2004, Einsehbar unter <http://www.medicine-worldwide.de/KrankheitKrebs/Brustrebs.html>, Besucht am 9.05.2004.
- Medicine-Worldwide**, Hyperthermie. Web-Seite vom 5.11.2002, Einsehbar unter <http://www.medicine-worldwide.de/KrankheitKrebs/Hyperthermie.html>, Besucht am 1.05.2004.
- Medicine-Worldwide**, Thermoablation. Web-Seite vom 5.11.2002, Einsehbar unter <http://www.medicine-worldwide.de/KrankheitKrebs/Hyperthermie.html>, Besucht am 1.05.2004.
- Miltenyi S, Müller W, Weichel W und Radbruch A** (1989) High Gradient Magnetic Cell Separation with MACS. Wiley-Liss, Inc, *Cytometry* 11: 231-238.
- Moore A, Marecos E, Bogdanov A, Weissleder R** (2000) Tumoral Distribution of Long-circulating Dextran-coated Iron Oxid Nanoparticles in a Rodent Model. *Radiology* 214: 568-574.
- Nanoscience**, Nanopartikel. Web-Seite von 2002, Einsehbar unter: http://www.nanoscience.de/group_r/ausstellung/anwendungen/medizin.shtml; besucht am 7.11.2004.
- O´Connell KA and Edidin M** (1990) A mouse lymphoid endothelial cell line immortalized by simian virus 40 binds lymphocytes and retains functional characteristics of normal endothelial cells. *J Immunol* 144: 521-525.
- O´Connell KA, Landmann G, Farmer E and Edidin M** (1991) Endothelial Cells Transformed by SV40 T Antigen Cause Kaposi´s Sarcomalike Tumors in Nude Mice. *Am J Pathol* 139: 743-749.
- O´Connell KA and Rudmann AA** (1993) Cloned Spindle and Epithelioid Cells from Murine Kaposi´s Sarcoma–Like Tumors Are of Endothelial Origin. *J Invest Dermatol* 100: 742 – 745.

8. Literaturverzeichnis

- Odenbach S** (2001), Ferrofluide – ihre Grundlagen und Anwendungen. Physik in unserer Zeit, 32. Jahrgang 2001, Nr.3: 122-127.
- Overgaard J, Gonzalez GD, Hulshof MC, Arcangeli G, Dahl O, Mella O und Bentzen SM** (1996) Hyperthermia as an adjuvant to radiation therapy of recurrent or metastatic malignant melanoma. A multicentre randomized trial by the European Society for Hyperthermic Oncology. Int J Hyperthermia 12: 3-20.
- Pschyrembel:** Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 258. Auflage, de Gruyter, Berlin 1998, S. 720.
- Ralph P et al.** (1975) Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody-dependent cell- mediated immunity. J. Immunol. 114: 898-905.
- Ralph P et al.** (1976) Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. J. Exp. Med. 143: 1528-1533.
- Ralph P and Nakoinz I** (1977) Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines: enhancement by PPD and LPS. J. Immunol. 119: 950-954.
- Ralph P and Nakoinz I** (1977) Direct toxic effects of immunopotentiators on monocytic myelomonocytic, and histiocytic or macrophage tumor cells in culture. Cancer Res. 37: 546-550.
- Ralph P and Nakoinz I** (1975) Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. Nature 257: 393-394.
- Remsen LG, McCormick CI, Roman - Goldstein S, Nilaver S, Weissleder R, Bogdanov A, Hellström KE, Hellström I, Kroll RA and Neuwelt EA** (1996) MR of Carcinoma – Specific Monoclonal Antibody Conjugated to Monocrystalline Iron Oxide Nanoparticles: The Potential for Noninvasive Diagnosis. Am J Neuroradiol 1996; 17: 411-418.
- Rübenach S:** Jeder vierte Gestorbene erlag im Jahr 2000 einem Krebsleiden. Statistisches Bundesamt Wiesbaden, Web-Seite vom 25.10.2001, Einsehbar unter: <http://www.destatis.de/presse/deutsch/pm2001/p3840092.htm>, Besucht am 23.10.2004.
- Schissel SL et al.** (1996) Zn²⁺-stimulated sphingomyelinase is secreted by many cell types and is a product of the acid sphingomyelinase gene. J. Biol. Chem. 271: 18431-18436.
- Shinkai M, Le B, Honda H, Yoshikawa K, Shimizu K, Saga S, Wakabayashi T, Yoshida J and Kobayashi T** (2001) Targeting Hyperthermia for Renal Cell

8. Literaturverzeichnis

- Carcinoma Using Human MN Antigen–specific Magnetoliposomes. Jpn. J. Cancer Res. 92: 1138-1146.
- Shinkai M, Suzuki M, Iijima S and Kobayashi T** (1994) Antibody – conjugated magnetoliposomes for targeting cancer cells and their application in hyperthermia. Biotechnol Appl Biochem 21: 125-137.
- Streck** (2004) persönliche Mitteilung, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Erlanger Allee 101, 07747 Jena.
- Taupitz M, Schmitz S, Hamm B**, (2003), Superparamagnetische Eisenoxidpartikel: Aktueller Stand und zukünftige Entwicklungen. RöFo- Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren; Band 175, Thieme, Stuttgart 2003, S. 652-765.
- Valdagni R und Amichetti M** (1993) Report of long-term follow-up in a randomized trial comparing radiation therapy and radiation therapy plus hyperthermia to metastatic lymphnodes in stage IV head and neck patients. Int J Radiat Oncol Biol Phys 28: 163-169.
- Vernon CC, Hand JW, Field SB, Machin D, Whaley JB, Zee J, Putten WL, Rhoon GC, Dijk JD, Gonzalez GD, Liu FF, Goodman P und Sherar M** (1996) Radiotherapy with or without hyperthermia in the treatment of superficial localized breast cancer: results from five randomized controlled trials. Int J Radiat Oncol Biol Phys 35: 731-744.
- Weissleder R, Lee AS, Khaw BA, Shen T, Brady TJ** (1992) Antimyosin-labeled monocrystalline iron oxide allows detection of myocardial infarct: MR antibody imaging. Radiology 182: 381-385.
- Wilhelm C, Gazeau F and Bacri JC** (2002) Magnetophoresis and ferromagnetic resonance of magnetically labeled cells. European Biophysics Journal, DOI 10.1007/s00249-001-0200-4.
- Wust P und Molls M** (1999), Hyperthermie in Kombination mit Radiotherapie und /oder Chemotherapie. Kompendium internistische Onkologie. Standards in der Diagnostik und Therapie. 3. Auflage, Springer, Berlin 1999, S. 536-540.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die in irgendeiner Form Anteil an dieser Arbeit haben.

Besonders danke ich:

- Dem Institutsdirektor Prof. Dr. med. Dipl. – Chem. Werner Kaiser für die freundliche Aufnahme am Institut
- Frau PD Dr. rer. nat. Ingrid Hilger für die Bereitstellung des Themas, die zuverlässige und kompetente Betreuung sowie für ihre Geduld und die konstruktive Zusammenarbeit
- Frau Dr. rer. nat. Christine Fritsche für die vielen guten Ideen und Denkanstöße, für die praktischen Tipps und die angenehme Zusammenarbeit
- Herrn Prof. Dr. med. Werner Linß (damaliger Direktor des Instituts für Anatomie I, FSU Jena) für die Hilfe bei der Erstellung und Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen
- Der Arbeitsgruppe um Dr. Roskos am Instituts für Klinische Chemie der FSU Jena, im Besonderen Frau Streck für die schnelle und zuverlässige Bestimmung der Eisenmengen mittels AAS
- Der Arbeitsgruppe um Dr. Claus für die unkomplizierte Bereitstellung von Zellen und Chemikalien
- Der Arbeitsgruppe um Dr. Hoffmann für die freundliche Bereitstellung von Arbeitsgeräten
- Der Arbeitsgruppe um Dr. Clement für die Bereitstellung des FACS Gerätes und die damit verbundene angenehme Zusammenarbeit
- Frau Yvonne Heyne und Frau Brigitte Maron für die Einführung in die Arbeitstechniken der Zellkultur, für die Hilfe bei der Beseitigung mancher Probleme und für die angenehme und freundschaftliche Zusammenarbeit
- Der Arbeitsgruppe der experimentellen Radiologie für die freundschaftliche Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft, vor allem meinen Mit-Doktoranden Thomas Becker, Axel Dübner, Romy Haag, Juliane Keil, Nadine Plötner und Susanne Polloczek

- Meiner Schwester Dipl. Medienwissenschaftlerin Christine Dietmar für die konstruktive Kritik, die moralische Unterstützung und die schnelle und unkomplizierte Hilfe bei vielen Computerfragen
- Dennis Linke für die Unterstützung bei der Bildbearbeitung und Formatierung
- Meinem Freund Marco Greis für die Geduld, den aufmunternden Zuspruch und die Unterstützung nicht nur in Computerfragen
- Meinen Eltern Gudrun und Günter Dietmar für den Antrieb, die moralische und auch finanzielle Unterstützung und für ihr Interesse an der Erstellung dieser Arbeit

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Elke Dietmar
Geburtsdatum	21.04.1980
Geburtsort	Gotha
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

Werdegang

1986 - 1991	EOS „Peter Neumann“, Sonneborn
1991 - 1998	„Ernst Wilhelm Arnoldi Gymnasium“, Gotha
10.07.1998	Abitur
1998 - 2000	Medizinstudium an der Otto von Guericke Universität in Magdeburg
14.09.2000	Physikum
10/2000	Weiterführung des Medizinstudiums an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
17.09.2001	Erstes Staatsexamen
03/2003 - 07/2005	Dissertation am Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena
15.09.2004	Zweites Staatsexamen
10/2004 bis 9/2005	Praktisches Jahr (PJ)
01.12.2005	Drittes Staatsexamen
seit 1/2006	Assistenzärztin am Katholischen Krankenhaus in Erfurt

Ehrenwörtliche Erklärung

- Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der FSU Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel , persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. I. Hilger, Prof. Dr. W. Linß, Dr. Ch. Fritsche, Frau Streck, Marco Greis, Dennis Linke, Christine Dietmar,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen
- dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 27.07.2005

Elke Dietmar